

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**FLÁVIO TARDIN**

**O PAPEL DO RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO  
AVANÇADA (RAGE) EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

**CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2020**

**FLÁVIO TARDIN**

**O PAPEL DO RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO  
AVANÇADA (RAGE) EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde para obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Barichello  
Co-orientadora: Dra. Jaqueline da Silva  
Generoso

**CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

T183p Tardin, Flávio.

O papel do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) em modelo experimental de meningite pneumocócica / Flávio Tardin. - 2019.  
64 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.  
Orientação: Tatiana Barichello.  
Coorientação: Jaqueline da Silva Generoso.

1. Meningite pneumocócica. 2. Receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE). 3. Processo inflamatório. I. Título.

CDD 23. ed. 616.82




UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

**ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 339**

Com início às 9h (nove horas) do dia onze de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Flavio Tardin Silva** sob a orientação da **Profa. Dra. Tatiana Barichello** intitulada “O PAPEL DO RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) EM MODELO EXPERIMENTAL DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Cristiane Ritter (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho (Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 10h (dez horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 11 (onze) de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte).

  
Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol  
Coordenador PPGCS  
Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol  
Coordenador do PPGCS

  
Fernanda Nunes Peruchi  
Assistente Administrativo

## **FOLHA INFORMATIVA**

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Ao amor da minha vida, Letícia Lauton,  
parceira perfeita em tudo.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Profa. Dra. Tatiana Barichello e co-orientadora Dra. Jaqueline Generoso, muito obrigado;

Aos colegas deliberativos que proporcionaram prazer e leveza à jornada.

*Sonhos determinam o que você quer.  
Ação determina o que você conquista.*

*Aldo Novak*



## RESUMO

A inflamação das meninges é conhecida como meningite que pode ser gerada pela bactéria *Streptococcus pneumoniae* que induz uma robusta resposta imunológica no hospedeiro. A doença evidencia alto índice de mortalidade e de morbidade em diversas partes do mundo, mesmo com todos os progressos nas pesquisas para atenuação da patologia. A meningite pneumocócica ativa os processos inflamatórios expandindo a produção de citocinas e quimiocinas, as quais acarretam uma série de sucessivos processos inflamatórios intermediários culminando na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na deposição de proteínas amiloides. Esse aumento e deposição do peptídeo  $\beta$ -amilóide propicia locais conexos para receptores de produtos finais da glicação avançada (RAGE) nos neurônios e micróglia. O processo relacionado ao RAGE com seu ligante pode ativar diversas vias de sinalização intracelular, abrangendo a ativação e translocação para o núcleo do fator de transcrição nuclear kappa B, que leva à produção de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, moléculas pró-inflamatórias e ao estresse oxidativo. Essa disfunção pode lesionar os neurônios ao ponto de causar dano de memória e aprendizagem e prejuízos à barreira hematoencefálica. O objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da via RAGE sobre parâmetros inflamatórios em ratos Wistar adultos submetidos ao modelo experimental de meningite pneumocócica tratados ou não com anti-RAGE (FPS-ZM1). Os animais foram divididos em 4 grupos: controle/salina, controle/FPS-ZM1, meningite/salina e meningite/ FPS-ZM1 foram mortos por decapitação em 10 dias após a indução da meningite e as estruturas hipocampo e córtex pré-frontal retiradas para avaliação os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, bem como deposição  $\beta$ -amilóide, expressão do receptor RAGE, tubulin, GFAP, CD11B, CD68, HMGB1 e NLRP3. Demonstrou-se que a meningite pneumocócica experimental desencadeou aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal, aumento da expressão de RAGE e  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> no córtex pré-frontal e hipocampo, ativação de células da microglia. A inibição direcionada de RAGE foi capaz de reduzir os níveis de citocinas, diminuir a expressão de RAGE e  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> e inibir a ativação de células microgliais. Essa sequência de eventos gerados pela meningite pneumocócica pode persistir por longo prazo após a recuperação e pode desencadear um declínio neurocognitivo; no entanto, o inibidor de RAGE atenuou o desenvolvimento de inflamação cerebral.

**Palavras-chave:** RAGE,  $\beta$ -amilóide, *Streptococcus pneumoniae*, meningite. Alzheimer.

## ABSTRACT

Inflammation of the meninges is known as meningitis which can be generated by the bacterium *Streptococcus pneumoniae* that induces a robust immune response in the host. The disease shows a high rate of mortality and morbidity in various parts of the world, despite all the progress in research to mitigate the disease. Pneumococcal meningitis activates inflammatory processes by expanding the production of cytokines and chemokines, which lead to a series of successive intermediate inflammatory processes culminating in the production of reactive oxygen species (ROS) and the deposition of amyloid proteins. This increase and deposition of the  $\beta$ -amyloid peptide provides related sites for advanced glycation end product (RAGE) receptors in neurons and microglia. The RAGE-related process with its ligand can activate several intracellular signaling pathways, including activation and translocation to the nucleus of nuclear transcription factor kappa B, which leads to the production of cytokines, chemokines, adhesion molecules, proinflammatory molecules and to oxidative stress. This dysfunction can damage neurons to the point of causing memory and learning damage and damage to the blood-brain barrier. The objective of this study was to evaluate the role of the RAGE pathway on inflammatory parameters in adult Wistar rats submitted to the experimental model of pneumococcal meningitis treated or not with anti-RAGE (FPS-ZM1). The animals were divided into 4 groups: control/saline, control/FPS-ZM1, meningitis/saline and meningitis/FPS-ZM1 were decapitated 10 days after meningitis induction and hippocampal and prefrontal cortex structures removed for Evaluation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 levels, as well as  $\beta$ -amyloid deposition, RAGE receptor expression, tubulin, GFAP, CD11B, CD68, HMGB1 and NLRP3. Experimental pneumococcal meningitis has been shown to trigger increased levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the prefrontal cortex, increased expression of RAGE and  $\beta$ -amyloid<sub>1-42</sub> in the prefrontal cortex and hippocampus, microglia cell activation. Targeted inhibition of RAGE was able to reduce cytokine levels, decrease RAGE and  $\beta$ -amyloid<sub>1-42</sub> expression and inhibit microglial cell activation. This sequence of events generated by pneumococcal meningitis may persist long-term after recovery and may trigger a neurocognitive decline; however, the RAGE inhibitor attenuated the development of brain inflammation.

**Keywords:** RAGE,  $\beta$ -amyloid, *Streptococcus pneumoniae*, meningitis, Alzheimer's.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Descrição dos casos confirmados de meningite no Brasil. ....	18
<b>Figura 2:</b> Fisiopatologia da meningite bacteriana. ....	21
<b>Figura 3:</b> Ativação do RAGE através de DAMPs e PAMPs e produção de $\beta$ -amiloide na fisiopatologia da meningite bacteriana. ....	25
<b>Figura 4:</b> Migração de leucócitos. ICAM, molécula de adesão intracelular; SNC, sistema nervoso central. ....	26
<b>Figura 5:</b> Esquema ilustrativo dos protocolos experimentais. ....	31
<b>Figura 6:</b> Níveis de TNF- $\alpha$ (a), IL-1 $\beta$ (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar adultos 10 dias após meningite pneumocócica tratados ou não com FPS-ZM1 (anti-RAGE). ....	36
<b>Figura 7:</b> Expressão de RAGE; $\beta$ -amilóide, CD11B; CD68, HMGB1; NLRP3, GFAP no córtex pré-frontal de ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de meningite pneumocócica. ....	38
<b>Figura 8:</b> Expressão de RAGE; $\beta$ -amilóide, CD11B; CD68, HMGB1; NLRP3, GFAP no hipocampo de ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de meningite pneumocócica. ....	39
<b>Figura 9:</b> Imunohistoquímica de IBA-1 de ratos Wistar submetidos à meningite experimental. (a) Imagens microscópicas representativas de campo (ampliação $\times$ 400) imunocoradas com IBA-1 no córtex pré-frontal. (b) Imagens de campo microscópico representativas (ampliação $\times$ 100 e $\times$ 400) imunocoradas com IBA-1 no hipocampo. ....	41
<b>Figura 10:</b> Imunohistoquímica de GFAP em ratos Wistar submetidos à meningite experimental. ....	43
<b>Figura 11:</b> Imunohistoquímica de RAGE em ratos Wistar submetidos à meningite experimental. ....	45
<b>Figura 12:</b> Imunohistoquímica de $\beta$ -amilóide <sub>1-42</sub> em ratos Wistar submetidos à meningite experimental. ....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs: Produtos da glicação avançada (do inglês *Advanced glycation end products*);

Akt: Proteína cinase B (do inglês: *Protein Kinase B*);

ALZT-OP1: Combinação de cromolênio de sódio e ibuprofeno;

APP: Proteína precursora amiloide (do inglês *Amyloid Precursor Protein*);

BACE: Enzima de clivagem de  $\beta$ -secreção (do inglês *beta-secretase enzyme*);

BHE: Barreira Hematoencefálica;

BHLCR: Células endoteliais da barreira hematolócica;

Casp1: Caspase 1;

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais;

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

COX-2: Ciclooxigenase 2;

DAMPs: Padrões moleculares associados ao dano (do inglês *Damage-Associated Molecular Pattern Molecules*);

DMSO: Dimetilsulfóxido;

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*);

EPM: Erro Padrão da Média;

ERN: Espécies reativas de nitrogênio;

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio;

FPS-ZM1: N-benzil-4-cloro-N-ciclo-hexilbenzamida

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (do inglês *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*);

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio;

HMGB1: proteína do grupo 1 de alta mobilidade (do inglês *high mobility group 1 protein*);

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$ ;

IL-6: Interleucina 6;

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível (do inglês *nitric oxide synthase*);

IRAK4: Receptor Associado a Quinase 4 (do inglês *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4*);

LCR: Líquido Cefalorraquidiano

LPS: Lipopolissacarídeo;

LTA: Ácido lipoteicóico (do inglês *lipoteichoic acid*);

Mac1: Antígeno de macrófagos  $\beta$ -integrina 1;

MBNE: Meningite bacteriana não especificada

MOB: Meningite por outras bactérias

MRP14: Proteína 14 relacionada com mieloides (do inglês *Migration Inhibitory Factor-related Protein 14*);

MYD88: Proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (do inglês *Myeloid differentiation primary response 88*);

N. meningitidis: Neisseria Meningitidis;

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate);

NF- $\kappa$ B: fator de transcrição nuclear kappa B;

NLRs: Nod-likes;

NLRP3: Receptore do tipo NOD contendo domínio de pirina 3

NO: Óxido nítrico (do inglês: *nitric oxide*);

NOX: NADPH oxidase;

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Radical ânion superóxido;

ONOO: Peroxinitrito;

PAFR: Receptor de fator ativador de plaquetas (do inglês Platelet Activating Factor Receptor);

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês Pathogen-Associated Molecular Pattern);

PCho: Fosforilcolina (do inglês Phosphocholine);

Ply: Pneumolisina;

PMNs: Leucócitos polimorfonucleares (do inglês Polymorphonuclear leukocytes);

PRR: Receptores de reconhecimento padrão (do inglês Pattern Recognition Receivers);

PspA: Proteína de superfície pneumocócica A (do inglês Pneumococcal Surface Protein A);

PspC: Proteína de superfície pneumocócica C (do inglês Pneumococcal Surface Protein C);

RAGE: Receptor de produtos finais da glicação avançada (do inglês receptor sites for advanced glycation end products);

S100 $\beta$ : Subunidade  $\beta$  da proteína ligante de cálcio S100;

SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (do inglês Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis);

SFKs: Quinases da família Src;

SNC: Sistema Nervoso Central;

SPSS: Statistical Package for the Social Science;

TLR9: Receptores transmembrana do tipo Toll

TLR: Receptor tipo Toll (do inglês: Toll-like Receptor);

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (do inglês Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ );

UFCol: Unidades formadoras de colônias.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.2	FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA.....	19
1.3	B-AMILÓIDE, RAGE E NEUROINFLAMAÇÃO .....	22
1.4	JUSTIFICATIVA .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1	Objetivo Geral .....	28
2.2	Objetivos Específicos .....	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA .....	29
3.2	CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	29
3.3	PREPARAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO INFECTANTE .....	29
3.4	MODELO ANIMAL DE MENINGITE.....	30
3.5	DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
3.5.1	Cálculo do tamanho da amostra .....	30
3.5.2	Protocolos experimentais .....	30
3.5.3	Tratamento .....	32
3.6	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e il10 .....	32
3.7	WESTERN BLOTTING .....	32
3.8	IMUNOHISTOQUÍMICA .....	33
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A meningite bacteriana é caracterizada como uma inflamação que ocorre nas meninges e no espaço subaracnóideo, podendo envolver ainda o córtex e o parênquima cerebral, o que se justifica pela estreita relação anatômica entre o líquido cefalorraquidiano (LCR) e o cérebro (Costerus et al., 2017). A inflamação é inicialmente induzida por uma invasão de bactérias no sistema nervoso central (SNC), através do LCR seguida de uma exacerbada resposta inflamatória do hospedeiro (Liechti et al., 2015).

Diversos agentes etiológicos podem causar a meningite bacteriana, como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus agalactiae* (Ellis et al., 2019), porém os mais comuns são a *Neisseria meningitidis* causador da chamada meningite meningocócica e *Streptococcus pneumoniae* responsável pela meningite pneumocócica (Thigpen et al., 2011). A meningite bacteriana é uma infecção com alto potencial de gravidade devido ao risco de sequelas e complicações a longo prazo, sendo o público infantil o mais atingido. Mesmo diante da implementação de diversos programas de vacinação e agentes antimicrobianos, a meningite bacteriana continua sendo uma doença de alta morbidade e mortalidade (Brasil, 2019).

Outro fator importante a ser destacado acerca da meningite bacteriana são as sequelas neurológicas, as quais são consideravelmente comuns entre pacientes que já tiveram a doença. Estudos apontam que em torno de 50% dos pacientes sobreviventes tenham permanecido com déficit sensorio motor, convulsões, prejuízos na capacidade cognitiva, memória e déficit de atenção, além de lentidão na resposta auditiva e cegueira (Mook-Kanamori et al., 2011).

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA

Dados levantados da Organização Mundial de Saúde acerca da meningite bacteriana denotam em todo mundo uma ocorrência de 1.2 milhões de casos, perfazendo um total de 170 mil mortes por ano, sendo mais incidente em países com recursos escassos. Não havendo tratamento, o percentual de mortalidade pode chegar em 70% (WHO, 2011). As taxas de incidência de meningite em países de alta renda (como Europa, Estados Unidos e Austrália) são de 0,8 - 2,6 a cada

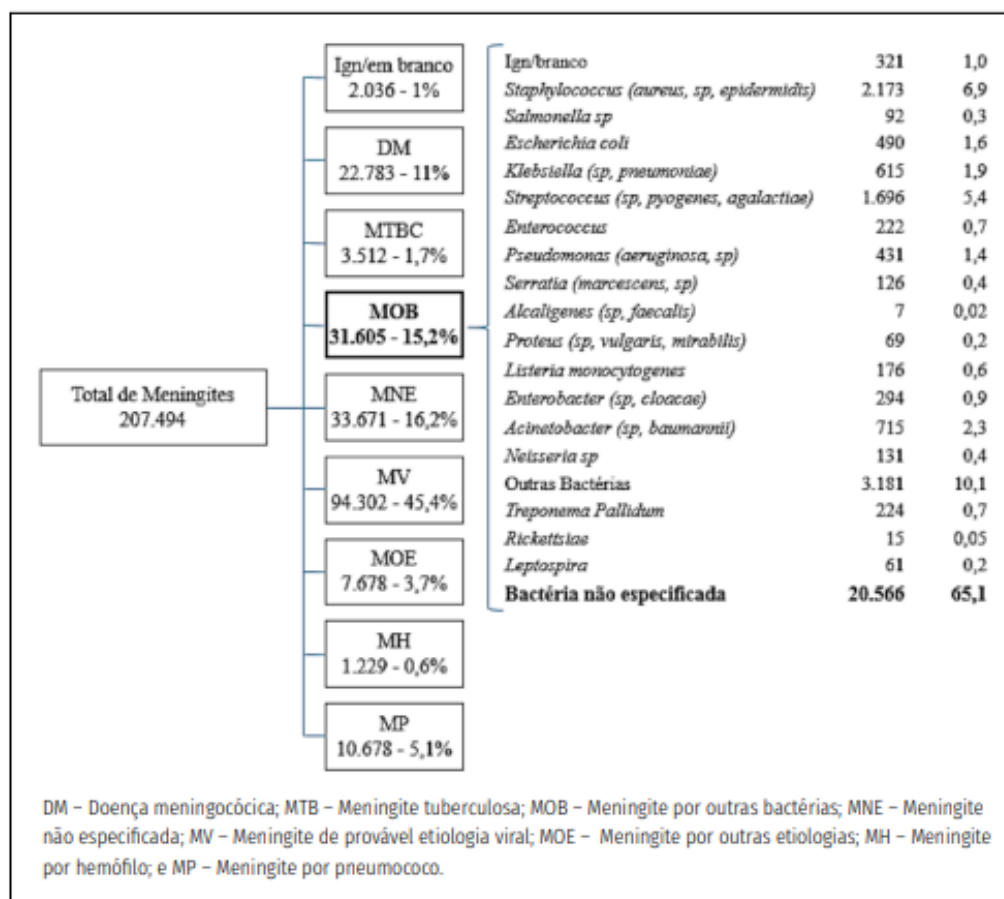


100.000 adultos por ano e pode ser até 10 vezes maior nos países em desenvolvimento (Engelen-Lee et al., 2016).

No Brasil, a meningite é endêmica e ocorrem surtos periodicamente em alguns municípios. Berenzi (2015, p. 3) alerta que os coeficientes de incidência da doença são instáveis, com “aproximados 1,8 casos para cada 100.000 habitantes”. Na medida em que em vários casos surgem, a maioria deles aparecem sem identificação do agente etiológico (Berenzi et al., 2015). Entre 2010 e 2016 no Brasil, um estudo relatou 7.392 casos de meningite pneumocócica, com uma letalidade em média de 29%. Esses valores ainda podem ser maiores pois há mais de 21 mil casos de meningite não especificada neste mesmo período (SINAN, 2017).

A mortalidade da doença é bastante elevada chegando a atingir de 18% a 20%. Quando a meningococemia é avaliada, “a letalidade chega a atingir coeficientes de quase 50%, mostrando a importância de se discutir estratégias de prevenção desta doença” (Berenzi, 2015).

O Boletim Epidemiológico aplicado ao Sistema Único de Saúde (SUS) traz uma amostra desses números no Brasil. Em pesquisa realizada sobre casos de meningite entre os anos de 2007 - 2016 foram confirmados 207.494 casos, dos quais 15,2% (31.605) foram classificados como meningite por outras bactérias (MOB) e entre estes casos, as meningites por bactérias não especificadas (MBNE) representaram 65,1% (20.566/31.605), como apresentados na figura abaixo (figura 1).



**Figura 1:** Descrição dos casos confirmados de meningite no Brasil (2007-2016). Fonte: BRASIL, 2019.

Dentre os diversos tipos de meningite bacteriana, os agentes causadores mais comuns são o *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*, variando seu predomínio de acordo com a faixa etária e a região (Brouwer et al., 2010; Thigpen et al., 2011). No Brasil, entre 2010 e 2016 foram apontados 7.392 casos de meningite pneumocócica cuja letalidade foi em média de 29% e 14.532 casos de meningite meningocócica, com taxas de mortalidade mais baixas, apesar de grande incidência (Lucas et al., 2016).

Através do uso de vacinas, grande parte dos países com alto poder aquisitivo conseguiram reduzir o percentual de taxas de meningite pneumocócica, estas não apresentadas somente pelas crianças e jovens vacinados, mas também por aqueles que não receberam a vacina, devido a diminuição na transmissão de bactérias (Hsu et al., 2009; Costerus et al., 2017). O Brasil, no ano de 2010, foi responsável por 1.163 casos instaurados de meningite pneumocócica, em 2016 conseguiu diminuir para 881 casos. Importante lembrar que em 1990, os casos de meningite chegaram a 28.000 casos (Epidemiologia, 2005).

É notório que as taxas de mortalidade têm ligação direta com a idade, agente causador e poder aquisitivo do país (Lucas et al., 2016). Uma meta-análise conseguiu provar que a probabilidade de sequelas depois da meningite bacteriana é diferente nos países de alta e baixa renda, sendo estes mais apresentados na África com 21,5% e Sudeste Asiático com 21,6%, comparando a Europa com 9,4% (Edmond et al., 2010). A meningite desenvolvida por *S. pneumoniae* possui as taxas mais elevadas de letalidade, sendo 20-37% nos países de renda alta e acima de 51% nos países com renda menor (Brouwer et al., 2010). Nesse percentual apresentado, até 30% dos sobreviventes ficam com sequelas neurológicas que se instalam em um prazo grande. Estas são: dificuldades cognitivas (6,3%), convulsões (3,7%), perda auditiva (11,2%), déficits motores (8,7%) e problemas comportamentais (6,8%) (Edmond et al., 2010). As sequelas especificadas podem manter-se por muitos anos e afetam especialmente as crianças no que concerne seu desenvolvimento cognitivo e intelectual (Grimwood et al., 2000; Grandgirard e Leib, 2010).

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA

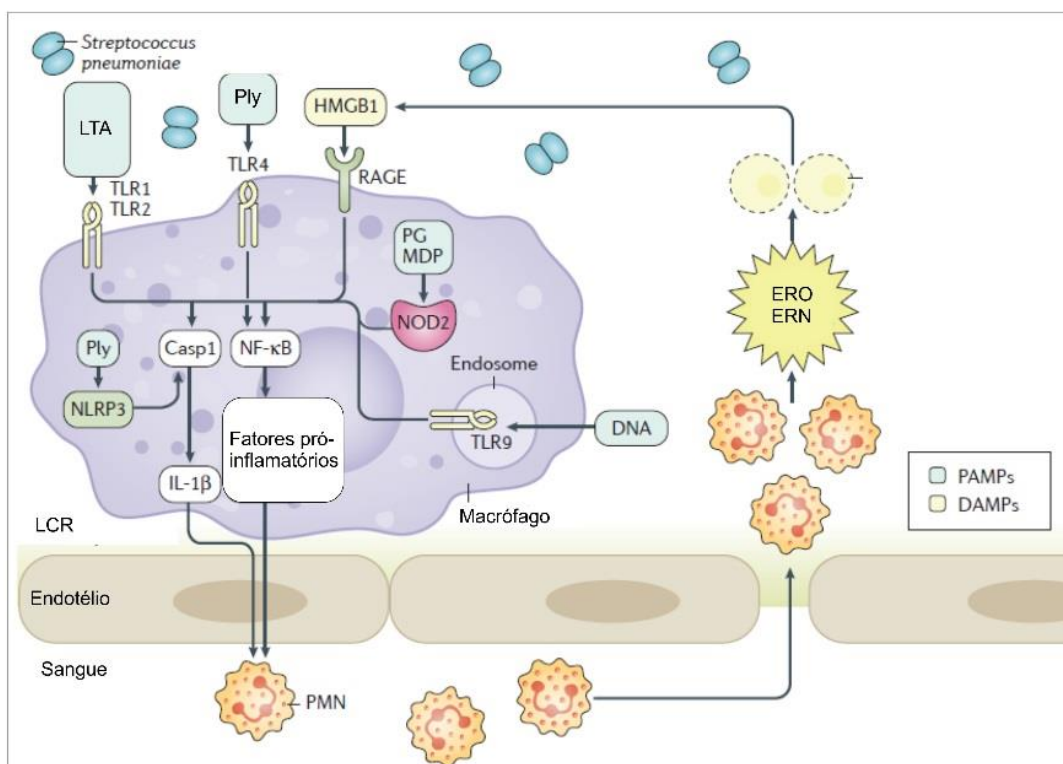
Um importante fator para o desenvolvimento da meningite bacteriana é a adesão e a colonização da nasofaringe pelo micro-organismo infectante (Koedel et al., 2002). A bactéria *S. pneumoniae* é um importante residente comensal da nasofaringe humana (Iovino et al., 2016). Um de seus mecanismos de virulência é a expressão de uma cápsula que reduz o seu aprisionamento no muco, permitindo assim que o pneumococo acesse as superfícies epiteliais (Nelson et al., 2007), promovendo a colonização, dificultando a fagocitose e a ativação do sistema complemento, importante para evitar a bacteremia após a colonização da mucosa (Bogaert et al., 2004). O hospedeiro é incapaz de erradicar o micro-organismo, que é capaz de invadir a mucosa e alcançar a circulação sanguínea (Somand e Meurer, 2009), sendo essa a principal rota para que as bactérias alcancem as meninges (Mook-Kanamori et al., 2011). Os mecanismos exatos pelos quais as infecções bacterianas ocorrem em alguns indivíduos, e não em outros, não são claros, mas parecem depender de uma interação complexa entre fatores ambientais (infecções prévias, tabagismo, abuso de álcool) e fatores genéticos do hospedeiro (Bogaert et al., 2004; Brouwer et al., 2009).

Ao atingir a corrente sanguínea, as bactérias terão que suportar um ambiente bactericida, e a cápsula de polissacarídeo serve de escudo contra sua opsonização (Koedel et al., 2010), tendo ainda, as proteínas de superfície pneumocócicas a e C (PspA e PspC) e a toxina pneumolisina que estão envolvidas na inibição da ativação do complemento e morte bacteriana (Costerus et al., 2017).

A invasão bacteriana no SNC pode ocorrer tanto após disseminação da bactéria pela corrente sanguínea ou por extensão de uma sinusite ou otite. A infecção do SNC também é possível através de uma má formação na dura-máter, após neurocirurgia ou trauma crânio-cervical (Sellner et al., 2010).

O *S. pneumoniae* pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) sem evidência de dano ou detecção do micro-organismo entre as células (Kim, 2003). Uma vez alcançado o LCR, a bactéria multiplica-se rapidamente, pois os níveis de complemento são inferiores aos do sangue, disseminando-se sobre toda a superfície do cérebro. Com o aumento da densidade bacteriana, elas começam a morrer em resposta a várias condições de estresse, privação de nutrientes e tratamento com antibióticos (Chiavolini et al., 2008) o que leva a uma rápida lise bacteriana com liberação de seus componentes como o ácido teicóico, peptidoglicano, DNA e fragmentos da parede celular (Koedel et al., 2010; Sellner et al., 2010; Mook-Kanamori et al., 2011).

Estes componentes são conhecidos como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), componentes fundamentais que induzem a resposta imune inata. A ativação de receptores Toll-likes (TLRs) e receptores Nod-likes (NLRs) que são PRRs, leva à ativação de fatores de transcrição inflamatórios, em particular o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Mook-Kanamori et al., 2011; Costerus et al., 2017), levando a uma grande liberação de moléculas pró-inflamatórias como citocinas e quimiocinas além de proteínas do complemento que irão ativar vias que visam a proteção (Koedel et al., 2002; Costerus et al., 2017), como exemplificado na figura 2.



**Figura 2:** Fisiopatologia da meningite bacteriana. Os padrões moleculares associados aos patógenos de (PAMPs) podem ativar células imunes dentro do líquido cefalorraquidiano (LCR) através de receptores Toll-likes (TLR1/2), TLR4 e TLR9, bem como receptores Nod-likes (NOD), NOD2, e contendo domínio de pirina 3 (NLRP3). O ácido lipoteicoide (LTA), a pneumolisina (Ply) e o DNA são reconhecidos por TLR1 / 2, TLR4 e TLR9, respectivamente. Essas interações resultam na ativação da enzima caspase 1 (Casp1), que catalisa a conversão da pró-forma de citocinas da família IL-1 na molécula ativa e de fatores de transcrição, como fator nuclear-κB (NF-κB), que por sua vez regula a produção de diversos fatores pró-inflamatórios, consequentemente, um grande número de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são recrutados. Essas células infiltrantes podem liberar numerosos produtos citotóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) que podem causar morte celular necrótica. As células bacterianas danificadas podem liberar sinais de alarme (os chamados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), incluindo a proteína 14 relacionada com mieloides (MRP14) e a caixa de grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1), que pode alimentar a inflamação interagindo com receptores, como TLR4 e receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE). Adaptado de Costerus et al., 2017.

Em resposta a invasão bacteriana, leucócitos polimorfonucleares migram da corrente sanguínea até a área da infecção, produzindo óxido nítrico (NO), radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).  $O_2^{\bullet-}$  e NO podem levar à formação de peroxinitrito (ONOO), este apresentando-se como um forte oxidante (KLEIN et al., 2006). Este oxidante desempenha resultados citotóxicos sobre as células endoteliais (Szabo, 2003), aumentando a permeabilidade da BHE, estimulando a peroxidação lipídica e produzindo outras relações intrincadas que estão implicadas na fisiopatologia da meningite pneumocócica (Klein et al., 2006). Estas mudanças inflamatórias auxiliam especialmente para a lesão do SNC

habitualmente associada com a meningite bacteriana (Polfliet et al., 2001).

### 1.3 $\beta$ -AMILÓIDE, RAGE E NEUROINFLAMAÇÃO

Inúmeras pesquisas demonstram que a inflamação no SNC exerce um grau de importância no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas (Rivest, 2009; Alison e Ditor, 2015; Chen et al., 2016). A meningite bacteriana causa uma resposta inflamatória capaz de danificar o tecido neuronal prejudicando a aprendizagem e a memória (Irazuzta et al., 2005).

O SNC, se comparado a outros órgãos, tem uma resposta inflamatória diferente. A absorção do organismo celular no cérebro em resposta à inflamação, à infecção e à lesão pode ser retardada e fraca, mas a resposta também pode ser induzida de maneira vertiginosa. Isto inclui a ativação da micróglia, complemento e citocinas (Allan et al., 2001). A colonização das bactérias no interior do espaçamento subaracnóide, propicia a liberação de citocinas a favor da inflamação (Janeway, 2007).

A micróglia é a chave principal do sistema imune inerente do SNC diretamente ligada à modulação de processos imunes e inflamatórios. Já na meningite pneumocócica, a atividade da micróglia se dá por vários estímulos que combinados se conectam na destruição do micro-organismo invasor (Barichello et al., 2013; Hu et al., 2014b).

Ao chegar ao SNC, à bactéria se propaga de maneira rápida, alcançando toda a extensão cerebral, causando uma rápida lise bacteriana com liberação de substâncias geradoras de inflamação como peptídeo glicano e resíduos da parede celular altamente imunogênicos e podem levar a uma elevação da resposta inflamatória por parte do hospedeiro (Koedel et al., 2010; Sellner et al., 2010), iniciando uma elevada liberação de moléculas pro inflamatórias, que por sua vez, elevam a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), permitindo a migração dos leucócitos para o SNC (pleocitose).

As lesões originadas pela meningite podem atingir diferentes regiões do cérebro (Kim et al., 1995) causando uma grande resposta imune, danificando o tecido neuronal e originando déficits neurológicos e cognitivos. (Irazuzta et al., 2005; Chen et al., 2009).

Compartilhando dos mecanismos em comum, as doenças neurodegenerativas estão ligadas à junção patológica de proteínas, como acúmulos fibrilares de amiloide em áreas vulneráveis do SNC (Tillement et al., 2010). Dentro da doença de Alzheimer, as proteínas tau fosforiladas constituem os emaranhados neurofibrilares com o peptídeo  $\alpha$ -amilóide, causando um acúmulo no meio extracelular em forma de amiloides, levando a morte neuronal (Haapasalo et al., 2010).

A doença de Alzheimer é uma das demências mais comuns de todo o planeta. A mesma é identificada pela presença do peptídeo  $\beta$ -amiloide, originado pela clivagem da proteína incitadora amiloide (APP) e desordens neurofibrilares, gerados pela hiperfosforilação da Tau (Cox et al., 2016; JI et al., 2016).

Foi identificado uma especificidade em pacientes com a doença de Alzheimer. Eles acumulam no parênquima cerebral fibras amiloides presentes na parede dos vasos sanguíneos, ligadas a uma grande diversidade de placas senis com acúmulo de filamentos irregulares da proteína tau que resulta na formação de emaranhados neurofibrilares (NFT), possuindo assim acentuada perda neuronal e sináptica (Selkoe, 2001).

A proteína precursora amiloide (APP) gera a produção, união e deposição do elemento  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) e placas senis (Hardy, 2002; Selkoe, 2002). O dano do DNA causado por radicais livres ou as alterações enzimáticas podem induzir ao início da apoptose presente na doença de Alzheimer (Stefanis, Park e Friedman, 1999). O cérebro atingido pela doença de Alzheimer é vulnerável à elevação do estresse oxidativo, assim notou-se uma queda no reparo do dano oxidativo, propiciando o acúmulo de DNA alterados, o que pode ser o responsável pelo avanço da perda neuronal (Parihar e Hemnani, 2004).

A doença se caracteriza pela grande perda neuronal, que propicia a redução das sinapses e instantaneamente morte celular, estresse oxidativo e uma grande inflamação, causando a queda progressiva da capacidade cognitiva e funcional, sendo um dos principais fatores que levam à incapacidade os indivíduos da terceira idade. Desta feita, estima-se que o número de pessoas afetadas pela doença supracitada deve elevar-se nos anos seguintes (Brookmeyer et al., 2007; Li et al., 2011).

As pesquisas tentam descobrir as relações ocultas que causam a doença de Alzheimer e novas provas indicam que a neuroinflamação pode aumentar o risco

ou até mesmo desencadear a doença de Alzheimer por ter mecanismos inflamatórios semelhantes (Su et al. 2016).

O depósito exacerbado de  $\beta$ -amiloide no tecido cerebral acelera o NF- $\kappa$ B, causando a secreção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase 2 (COX-2) através da micróglia (Kang et al., 2001; Martin-Moreno et al., 2011). O peptídeo  $\beta$ -amiloide também pode ativar os receptores para os produtos finais de glicação avançada (RAGE), que intermedeia eventos em cadeia, exacerbando a inflamação e o dano oxidativo (Fang et al., 2010; Carrano et al., 2011).

O RAGE é uma proteína transmembrana capaz de identificar moléculas tridimensionais, proporcionando o contato com vários ligantes (Deane et al., 2012). Complementarmente, o RAGE tem papel de importância na imunidade inata contra agentes patogênicos, mas, também ligados a outros agentes ligantes endógenos, gerando a inflamação crônica (Fang et al., 2010; Zong et al., 2010). Os produtos de glicação avançada (AGEs), como o RAGE, tem muitos ligantes importantes, semelhantes à proteína do grupo 1 de grande mobilidade (HMGB1), subunidade  $\beta$  da proteína ligante de cálcio S100 (S100 $\beta$ ), peptídeos  $\beta$ -amiloide, entre outros (Takuma et al., 2009; Carrano et al., 2011).

O contato de RAGE com seu ligante (a exemplo do  $\beta$ -amiloide) tem a capacidade de proporcionar inúmeros meios de sinalização intracelular, inclusive o estímulo e a translocação para o núcleo do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, onde se originam a transcrição de citocinas, quimiocinas, moléculas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e estresse oxidativo, resultando na inflamação (Fang et al., 2010; Deane et al., 2012). Nota-se também inúmeras sequelas no SNC com a extensão da neuroinflamação e a elevação do influxo de  $\beta$ -amiloide através da BHE (Takuma et al., 2009; Fang et al., 2010; Carrano et al., 2011; Deane et al., 2012).

A ativação da micróglia por meio dos oligômeros de  $\beta$ -amiloide pode assemelhar-se com a estimulação através de células bacterianas, como o lipopolissacarídeo (LPS) (Heneka et al., 2015).

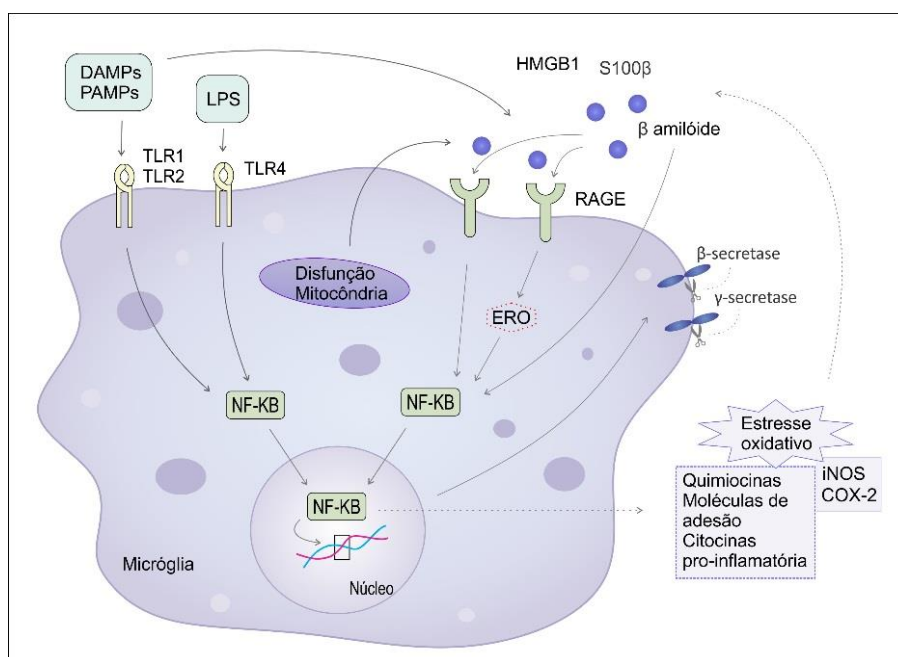
Com o avanço dos estágios de  $\beta$ -amiloide, pode se tornar significativo a manifestação de RAGE. Pesquisas indicam que os peptídeos  $\beta$ -amiloide acarretam toxicidade direta a neurônios e ativam inflamação via micróglia, resultando na secreção de citocinas pró-inflamatórias com decorrências citotóxicas. De maneira inicial, os micro-organismos da micróglia causam danos ao peptídeo  $\beta$ -amiloide, mas



com o depósito destas células, chegam à exaustão, sendo a causa de prejuízo neuronal e com provável déficit cognitivo (Cox et al., 2016).

Uma vez em atividade, o RAGE por intermédio de seu ligante gera um retorno positivo entre RAGE e NF- $\kappa$ B, levando a um ciclo vicioso entre o esgotamento oxidativo e a inflamação, levando a elevação de  $\beta$ -amiloide e instantaneamente a ativação de NF- $\kappa$ B, gerando um aumento dos níveis de RAGE.

Com o nível de RAGE elevado, este interage com seus ligantes, elevando os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ativando o NF- $\kappa$ B repetidamente (Carrano et al., 2011; Zhang et al., 2013) como apresentado na Figura 3. Complementarmente, a ativação de RAGE pode acontecer através do HMGB1, elevado nos fluidos extracelulares em doenças inflamatórias, assim como a S100 $\beta$ , proteína relevante na disfunção do SNC (Sims et al., 2010).

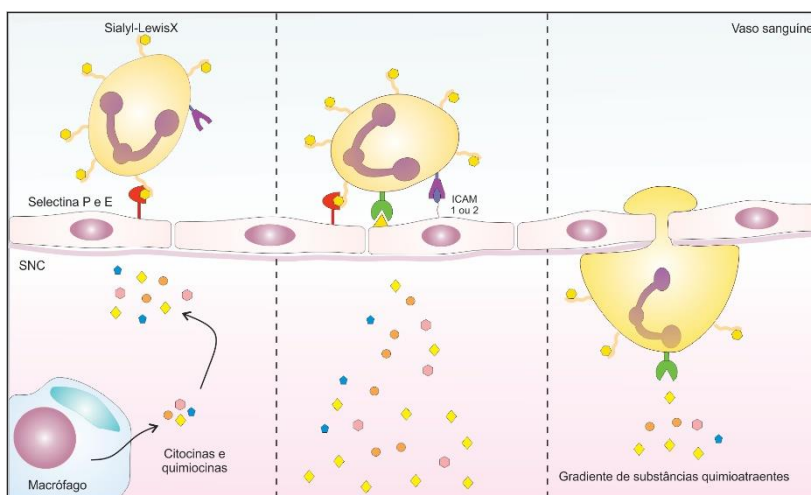


**Figura 3:** Ativação do RAGE através de DAMPs e PAMPs e produção de  $\beta$ -amiloide na fisiopatologia da meningite bacteriana. O RAGE reconhece proteína do grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1), subunidade  $\beta$  da proteína ligante de cálcio S100 (S100 $\beta$ ), peptídeos  $\beta$ -amiloide, que ativa NF- $\kappa$ B levando a produção de citocinas, quimiocinas, moléculas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e estresse oxidativo. Componentes bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS) também pode aumentar a produção de  $\beta$ -amiloide, bem como um aumento na atividade de  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase. Fonte: Collodel, A, 2017.

O bloqueio da sinalização de RAGE utilizando anticorpos RAGE tem sido previamente feito em modelos de inflamação e sepse e observou-se que sua inibição teve um impacto significativo na sepse, principalmente por meio de atenuação de sinalização pró-inflamatória (Van Zoelen et al., 2009). Estratégias terapêuticas

sugerem que RAGE é um importante alvo para o tratamento de doenças inflamatórias, visto que a inflamação aumenta a síntese de  $\beta$ -amilóide e regula positivamente RAGE, e a ativação dessa via induz disfunção cognitiva em longo prazo por apoptose neuronal. Além disso, a toxicidade de  $\beta$ -amilóide induz ainda mais disfunção mitocondrial nesse processo (Gong et al., 2010; Han et al., 2011).

Com a formação de citocinas, os leucócitos polimorfonucleares migrados produzem volumoso ERO (Kastenbauer et al., 2002). O composto sulfatado de glicoproteínas que se hospeda na superfície dos leucócitos se liga as selectinas P e E das células endoteliais. Esta união se torna potencialmente mais forte quando o CXCL-8 se agrega ao receptor característico nos neutrófilos. As citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  são importantes por instigar a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e ICAM-2. A passagem de neutrófilos em caminho ao gradiente de substâncias quimioatraentes se dá pela união entre as células endoteliais e ICAM-1 (Hanna e Etzioni, 2012). Este causa a origem do estresse oxidativo, fabricação e atividade de citocinas e quimiocinas, elevando a atividade dos neutrófilos, peroxidação lipídica, lesando o DNA, nitração de tirosina, a liberação de metalproteinases de matriz e fabricação de prostaglandina (Klein et al., 2006) (figura 4).



**Figura 4:** Migração de leucócitos. ICAM, molécula de adesão intracelular; SNC, sistema nervoso central. Fonte: (GENEROSO, 2017).

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

A meningite pneumocócica e neurodegeneração possuem uma sobreposição de mecanismos associados à disfunção cerebral. Em longo prazo a

deficiência cognitiva e declínio funcional da meningite são semelhantes às observadas em doença de Alzheimer

Uma maior compreensão dos fatores de risco para desenvolvimento de doenças neurodegenerativas tem grande importância, a fim de prevenir e reduzir danos provocados pela doença. Estudos de ciência básica poderiam colaborar para a melhora da compreensão das associações entre doença de Alzheimer e as infecções e maneiras de controlar esta doença altamente prevalente e debilitante.

Portanto, desenvolver estudos que esclareçam a fisiopatologia da meningite bacteriana é de suma importância, bem como a identificação de possíveis alvos terapêuticos que possam diminuir danos neurológicos causado aos pacientes. Estudos mostram um papel importante da via  $\beta$ -amiloide/RAGE na exacerbação da resposta inflamatória dentro do SNC e que a inibição de RAGE pode diminuir essa inflamação. Desde modo, o uso de um anticorpo anti-RAGE poderia diminuir a resposta imune do hospedeiro prevenindo danos ocasionados pela meningite pneumocócica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a deposição de proteína  $\beta$ -amilóide está associada à disfunção cognitiva em longo prazo em sobreviventes de meningite pneumocócica e se a modulação da inflamação com um inibidor específico de RAGE pode minimizar esse efeito.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos tratados ou não com anti-RAGE 10 dias após a indução da meningite pneumocócica;
- Avaliar os níveis de deposição  $\beta$ -amiloide, expressão do receptor RAGE, tubulin, GFAP, CD11B, CD68, HMGB1, NLRP3, IBA-1 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos tratados ou não com anit-RAGE 10 dias após a indução de meningite pelo *S. pneumoniae*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiopatologia Experimental, da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil. O estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais.

Este projeto tem aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 21/2015-2) da UNESC. Sendo assim, todos os cuidados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos foram adotados.

#### 3.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para este estudo, foram utilizados ratos Wistar machos, adultos com 60 dias de vida, saudáveis, pesando entre 250 e 300 g, procedentes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), onde ficaram acondicionados em caixas com, no máximo, cinco animais, com comida e água *ad libitum*, mantidos em ambiente com temperatura de 23 °C +/- 1 °C e umidade relativa entre 55 e 65%, num ciclo de 12 horas claro-escuro (7h às 19h).

Foram excluídos do estudo os animais que apresentaram qualquer má-formação aparente; peso inferior a 250 g ou superior a 350 g; animais que já foram usados em experimentos anteriores; animais que eventualmente morreram durante o experimento, antecedendo o tempo de eutanásia pré-estabelecido.

#### 3.3 PREPARAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO INFECTANTE

*S. pneumoniae*, sorotipo III, proveniente do Instituto Adolfo Lutz, foi cultivado durante a noite em 10 mL de caldo Todd Hewitt, diluído em meio fresco e crescido até a fase logarítmica. No dia do experimento, a cultura foi centrifugada durante 10 min a 5000 x g e novamente suspensa em solução salina estéril até a concentração de  $5 \times 10^9$  UFCol/mL (Grandgirard, Steiner, et al., 2007).

### 3.4 MODELO ANIMAL DE MENINGITE

Todos os procedimentos de manipulação do modelo experimental de meningite bacteriana foram realizados sob anestesia, composta de uma administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) (Grandgirard, Schurch, et al., 2007; Hoogman et al., 2007).

Para indução da meningite bacteriana, os animais foram devidamente anestesiados e posicionados no estereotático e submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha calibre 23, recebendo 10 µL de solução salina estéril como placebo para o grupo controle ou volume equivalente de suspensão bacteriana de *S. pneumoniae* para o grupo meningite. Imediatamente após a inoculação, os animais receberam reposição volêmica (subcutânea) e foram devolvidos às suas respectivas gaiolas (Irazuzta et al., 2002; Irazuzta et al., 2008). A meningite foi documentada a partir de uma cultura quantitativa de 5 µL de LCR obtidos por punção da cisterna magna (Barichello et al., 2010). Dezoito horas após a indução da meningite os animais receberam tratamento com antimicrobiano (100 mg/kg de ceftriaxona) a cada 12 horas durante 7 dias.

### 3.5 DESENHO EXPERIMENTAL

#### 3.5.1 Cálculo do tamanho da amostra

Com base em estudos prévios em pacientes e estudos em modelos animais, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra de 6 animais por grupo para os testes imunoquímicos, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%.

#### 3.5.2 Protocolos experimentais

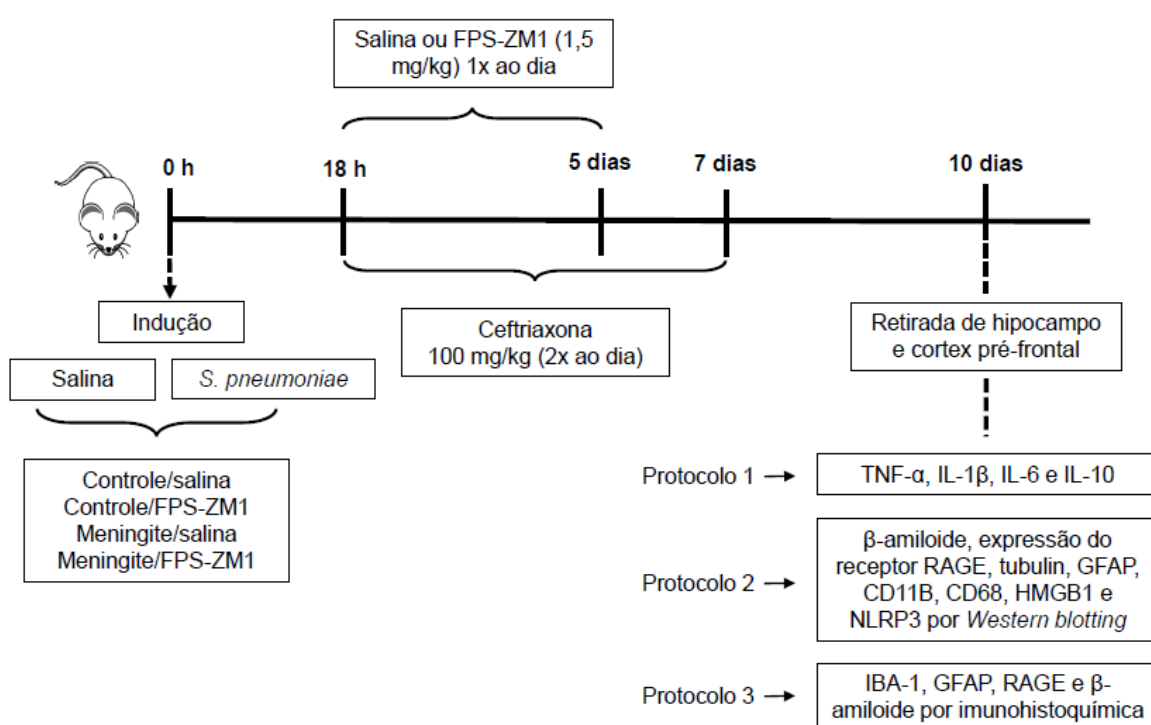
Foram realizados 3 (três) protocolos experimentais.

Protocolo 1: para avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 em 10 dias após a indução. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle/salina (n = 6), controle/FPS-ZM1 (n = 6), meningite/salina (n = 6) e meningite/FPS-ZM1 (n = 6) e o

hipocampo e córtex pré-frontal dissecados para as dosagens. Totalizando 24 animais, que foram tratados com salina ou inibidor de RAGE (FPS-ZM1 - 1,5 mg/kg, Millipore Sigma, Cat no. 553030).

Protocolo 2: para avaliação da expressão de deposição  $\beta$ -amiloide, expressão do receptor RAGE, tubulin, GFAP, CD11B, CD68, HMGB1 e NLRP3, os animais foram divididos nos mesmos grupos descritos acima: controle/salina ( $n = 6$ ), controle/FPS-ZM1 ( $n = 6$ ), meningite/salina ( $n = 6$ ) e meningite/ FPS-ZM1 ( $n = 6$ ) e o hipocampo e córtex pré-frontal dissecados para as dosagens. Totalizando 24 animais tratados com salina ou inibidor de RAGE (FPS-ZM1 - 1,5 mg/kg, Millipore Sigma, Cat no. 553030).

Protocolo 3: para imunocoloração de marcador microglial, de astrócticos,  $\beta$ -amiloide e RAGE, os animais foram divididos nos mesmos grupos descritos acima e eutanasiados em 10 dias após a indução e o hipocampo e córtex pré-frontal dissecados para as dosagens. Totalizando 24 animais tratados com salina ou inibidor de RAGE (FPS-ZM1 - 1,5 mg/kg, Millipore Sigma, Cat no. 553030).



**Figura 5:** Esquema ilustrativo dos protocolos experimentais. Figura elaborada pelo autor, 2019.

Após os experimentos, todos os animais foram devidamente eutanasiados com uso de guilhotina, sob estrita obediência às Diretrizes para a Prática de Eutanásia (CONCEA, 2013). O descarte foi feito por acondicionamento em saco

branco leitoso, identificados como “lixo infectante” e levados para um freezer de resíduos localizado no biotério da UNESC para a conservação até o momento de coleta por uma empresa terceirizada, que fez o tratamento e disposição final, conforme RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

### 3.5.3 Tratamento

Os animais receberam 1,5 mg/Kg de N-benzil-4-cloro-N-ciclohexilbenzamida (FPS-ZM1) (Millipore Sigma - Cat no. 553030), anti-RAGE, dissolvidos em 1% de DMSO 1% e solução salina ou salina estéril por via intraperitoneal, conforme grupo experimental, uma dose por dia durante 5 dias, iniciando em 18 horas após a indução.

### 3.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF-A, IL-1B, IL-6 E IL10

As estruturas foram homogeneizadas em solução de extração (100 mg de tecido por 1 mL) contendo: 0,4 mol/L de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA, 0,1 mmol/L de fluoreto de fenil metil sulfonil, 0,1 mmol/L de cloreto de benzetônio, 10 mmol/L de EDTA e 20 de KI a aprotinina, utilizando Ultra-Turrax (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). O homogenato de cérebro foi centrifugado a 3000 x g durante 10 min a 4 °C, e os sobrenadantes recolhidos e armazenados a -20 °C. A concentração de citocinas foi determinada utilizando a metodologia de enzima e um ensaio de ELISA. Os sobrenadantes do tecido cerebral foram dosados conforme kit ELISA utilizando anticorpos comercialmente disponíveis, de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN). Os resultados foram mostrados em pg/100 mg de tecido cerebral.

### 3.7 WESTERN BLOTTING

Para executar as o Western blotting, as amostras foram primeiro homogeneizadas em tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol). As concentrações de proteínas foram analisadas pelo método de Lowry (1951), e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína, foi utilizado 30 µg para a eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando gel 10-15% (Leal et



al., 2002). As proteínas separadas foram, em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. A carga de proteína e a eficiência da transferência foram verificadas com coloração Ponceau S. Após os sítios de proteínas inespecíficos foram bloqueados por uma hora de incubação com solução bloqueadora (5% albumina em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20). Posteriormente, as membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo de  $\beta$ -amiloide (87 kDa), RAGE (45 kDa), tubulina (50 kDa), GFAP (55,48 kDa) CD11B (127 kDa), CD68 (35 kDa), HMGB1 (25 kDa) e NLRP3 (114 kDa). Após a incubação, o anticorpo primário foi removido e as membranas lavadas quatro vezes durante 15 min. Após a lavagem, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:2500) foram aplicados à membrana e uma incubação por 2 h à temperatura ambiente foi realizada e as membranas foram lavadas novamente. As bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS - Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Carr et al.). A quantificação das bandas foi avaliada utilizando-se o Software Image Lab (Bio-Rad). Seguidamente, a membrana foi submetida ao processo de 'stripping' e incubada com um anticorpo contra GAPDH na presença de 5% de leite. Após a lavagem, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:10000) foram aplicados à membrana e uma incubação por 1 hora à temperatura ambiente será realizada e as membranas lavadas novamente. Finalmente, as bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS-Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Carr et al.). A densitometria das bandas foi avaliada utilizando-se o Software Image Lab (Bio-Rad).

### 3.8 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a imunocoloração, foram utilizadas amostras de tecido cerebral fixadas em formalina e embebidas em parafina. A desparafinização e reidratação foram realizadas usando uma série de xilenos, álcoois graduados e água. A recuperação de antígeno à base de calor foi realizada usando uma solução de citrato de sódio 1% para recuperação de antígeno com pH 9 (Agilent Technologies, Santa

Clara, CA) por 30 minutos a 95 °C, seguidos por 30 minutos em gelo. As etapas de lavagem subsequentes foram realizadas usando uma solução salina tamponada com fosfato 1x (PBS) (Bio-rad, EUA). A solução de peróxido de hidrogênio a 3% (VWR International, Radnor, PA) usada para bloquear a peroxidase endógena por 10 minutos. As seções de tecido foram bloqueadas à temperatura ambiente com soro de cavalo a 2,5% (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Após a etapa de bloqueio, o anticorpo primário  $\beta$ -amilóide (1-42) (Abcam, ab10148, 1: 1000), IBA-1 (Abcam, ab178846, 1: 1000), GFAP (Abcam, ab7260, 1: 1000) e RAGE (Abcam, 216329, 1: 2000) foi adicionado e mantido a 4 °C durante a noite. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS e o anticorpo secundário biotinilado de cabra anti-coelho (Millipore, MA, EUA) foi aplicado por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, o complexo Avidin-Biotin (ABC) foi adicionado por 1 hora. Após etapas de lavagem adicionais, o antígeno alvo foi visualizado usando cromogênio DAB em tampão de substrato (Vector, Burlingame, CA). Para a contra-coloração, foi aplicada hematoxilina e as lâminas foram levadas ao xileno e montadas com Permount™ (Fischer Chemicals). A coloração foi visualizada usando Nikon ECLIPSE Ci-S (Nikon Instruments, Tóquio, Japão) e as imagens foram capturadas (ampliação  $\times 40$ ).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

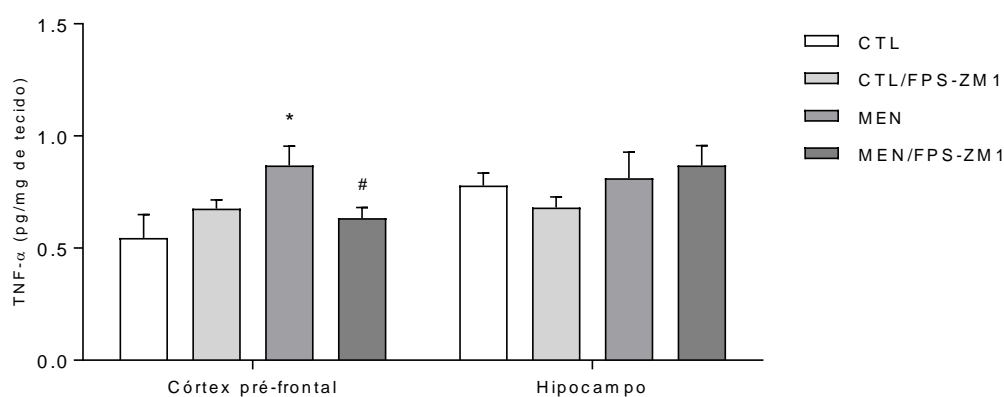
Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade usando o teste de Levene. Quando os dados foram normais e homogeneidade de variância confirmada, foram utilizados testes paramétricos; se os dados não cumpriram estas condições, foram utilizados os testes não-paramétricos.

Para todas as análises, os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. Em todas as comparações,  $p < 0,05$  foi considerado significativamente estatístico. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 20.0.

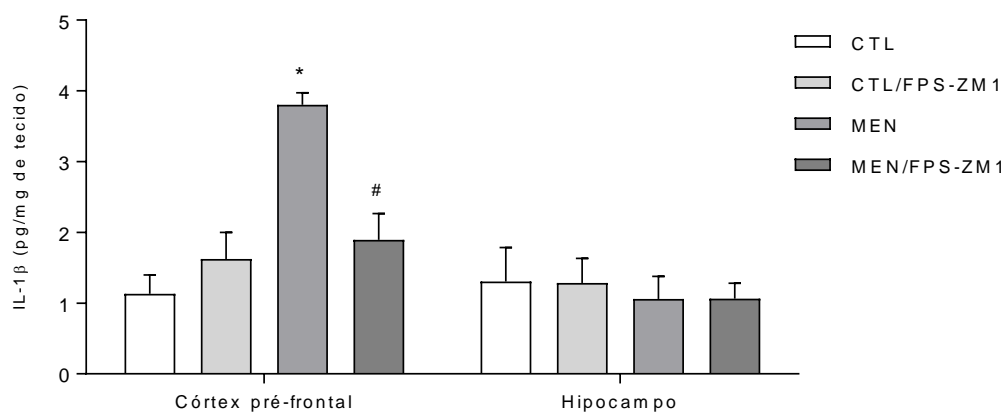
## 4 RESULTADOS

A figura 6 mostra o efeito do inibidor FPS-ZM1 sobre os níveis de TNF- $\alpha$  (a), IL-1 $\beta$  (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) 10 dias após a indução de meningite pneumocócica no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar adultos. Os níveis de TNF- $\alpha$  (Fig. 6a) e IL-1 $\beta$  (Fig. 6a) foram aumentados no córtex pré-frontal quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). No entanto, a inibição de RAGE diminuiu os níveis dessas citocinas. Os níveis de IL-6 não foram alterados em nenhuma das estruturas avaliadas (figura 6c). No hipocampo, o tratamento com inibidor de RAGE aumentou os níveis de IL-10 quando comparado ao grupo controle (Fig. 6d,  $p < 0,05$ ).

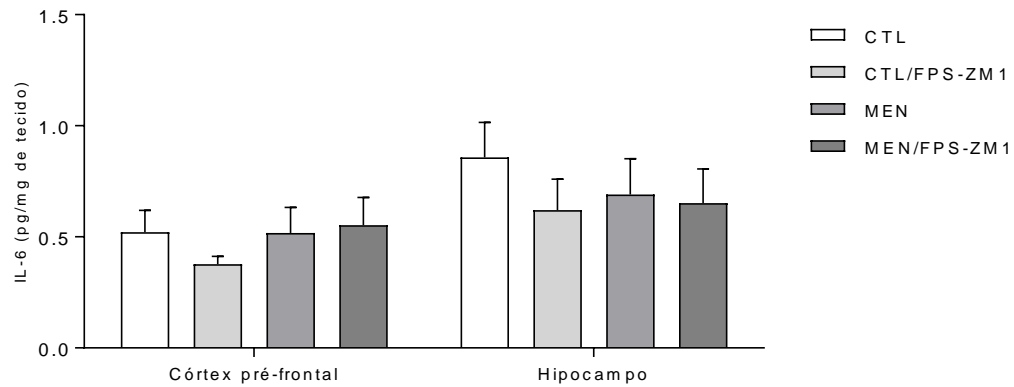
a)



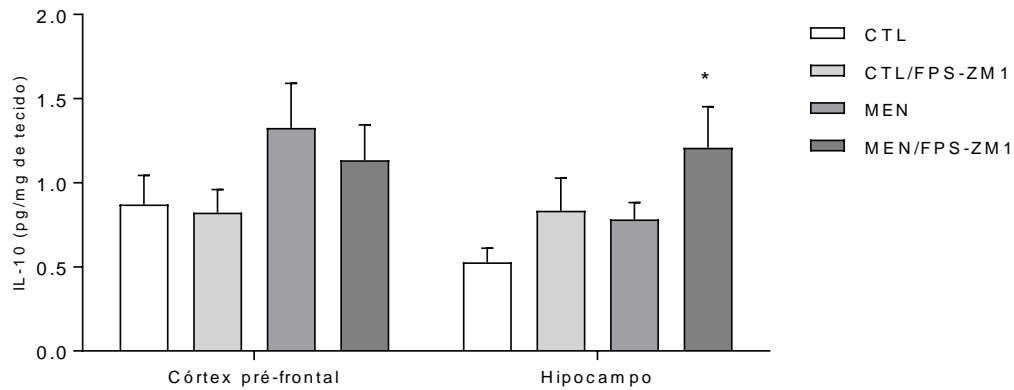
b)



c)



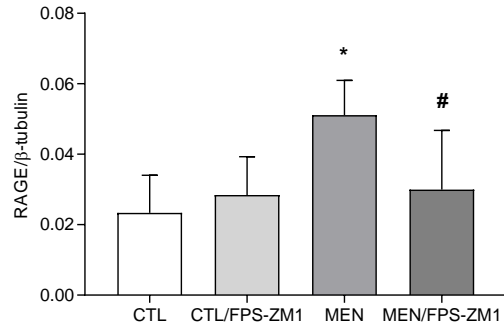
d)



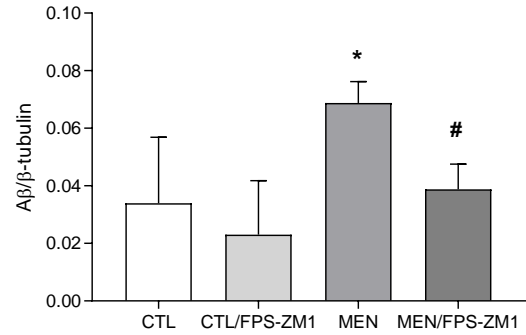
**Figura 6:** Níveis de TNF- $\alpha$  (a), IL-1 $\beta$  (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar adultos 10 dias após meningite pneumocócica tratados ou não com FPS-ZM1 (anti-RAGE). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  SEM e analisados por ANOVA de duas vias.

A figura 7 ilustra a expressão de RAGE (a),  $\beta$ -amilóide (b), CD11B (c), CD68 (d), NLRP-3 (e), HMBG1 (f) e GFAP (g) no córtex pré-frontal de ratos Wistar por 10 dias após a indução de meningite por *S. pneumoniae* e tratados com anti-RAGE ou não. A expressão de RAGE,  $\beta$ -amilóide, CD11B e CD68 aumentou 10 dias após a indução da meningite; no entanto, a inibição de RAGE diminuiu a expressão desses marcadores (figura 7a, b, c, d,  $p < 0,05$ ).

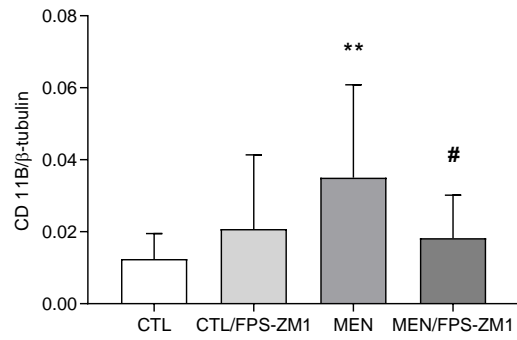
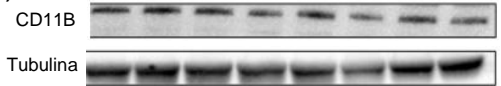
a)



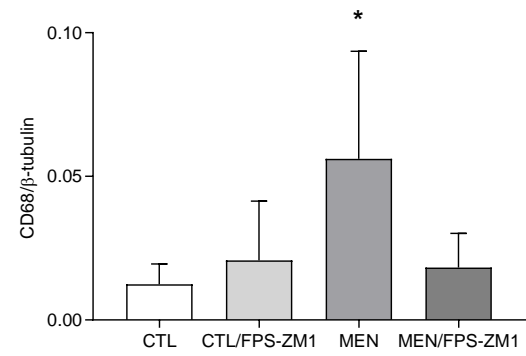
b)



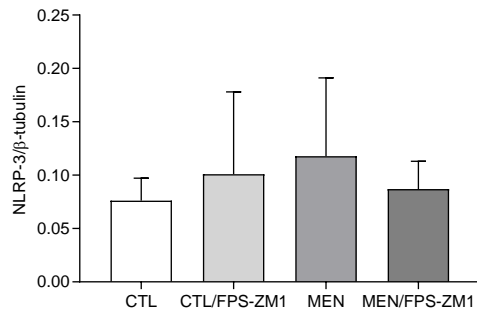
c)



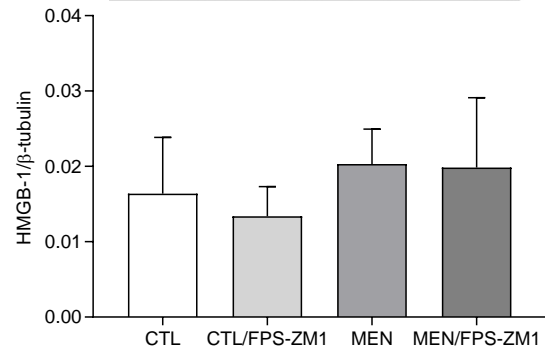
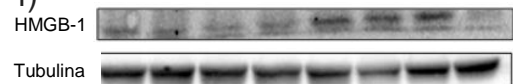
d)

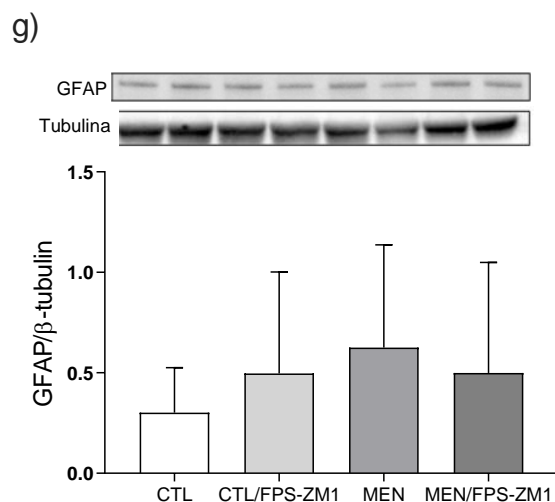


e)



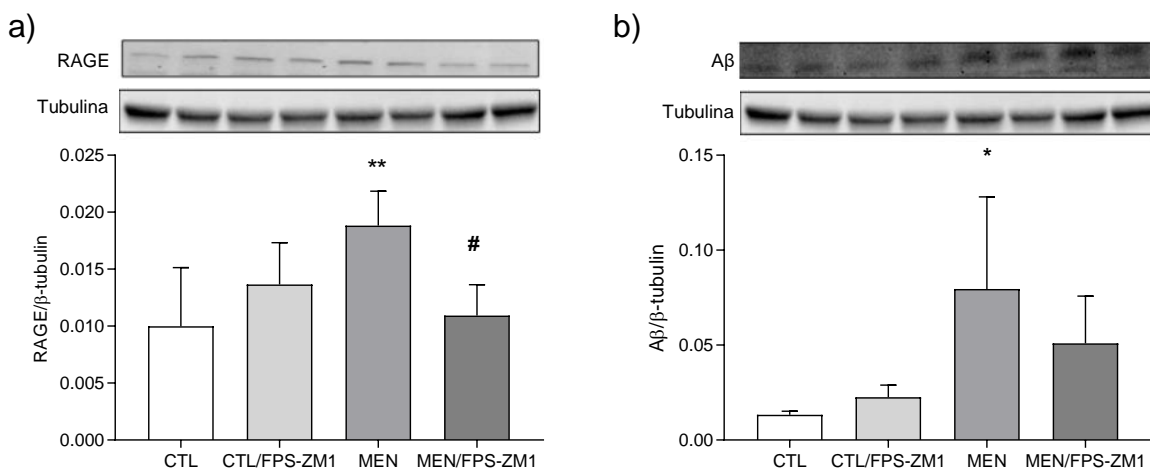
f)

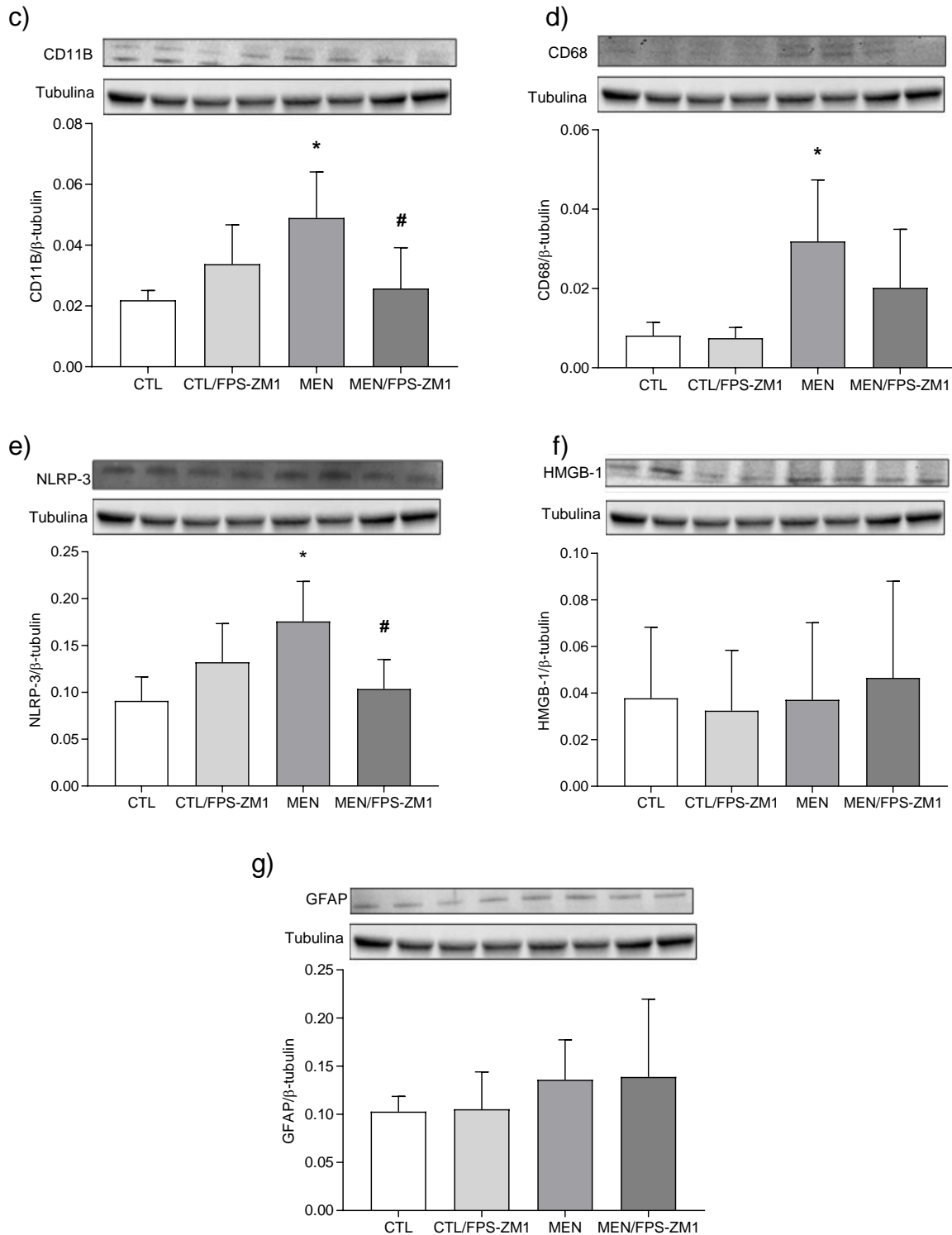




**Figura 7:** Expressão de RAGE;  $\beta$ -amilóide, CD11B; CD68, HMGB1; NLRP3, GFAP no córtex pré-frontal de ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de meningite pneumocócica. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SEM e os grupos foram comparados por meio ANOVA e teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  indicam significância estatística comparada ao grupo controle; # $p < 0,05$  indicam significância estatística quando comparados ao grupo da meningite. Figura elaborada pelo autor, 2019.

Na figura 8 tem-se a expressão RAGE (a),  $\beta$ -amilóide (b), CD11B (c), CD68 (d), NLRP-3 (e), HMGB1 (f) e GFAP (g) no hipocampo de ratos Wistar tratados ou não com anti-RAGE 10 dias após indução de meningite pneumocócica. Houve aumento da expressão de RAGE,  $\beta$ -amilóide, CD11B, CD68 e NLRP-3 quando comparado ao grupo controle (figura 8a, b, c, d, e,  $p < 0,05$ ). Entretanto, o tratamento com inibidor de RAGE diminuiu a expressão de RAGE, CD11B e NLRP3 (figura 8a, c, d,  $p < 0,05$ ).

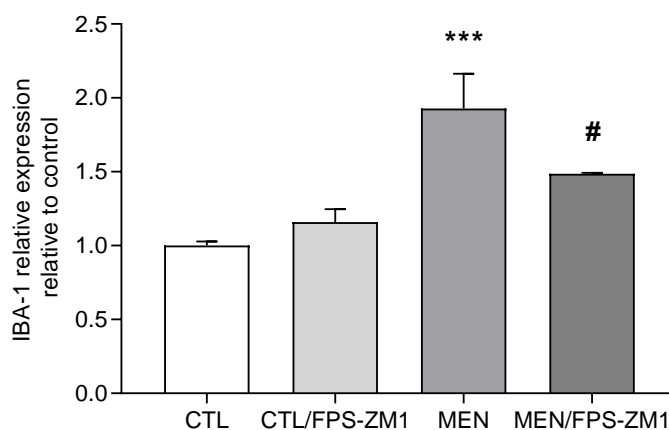
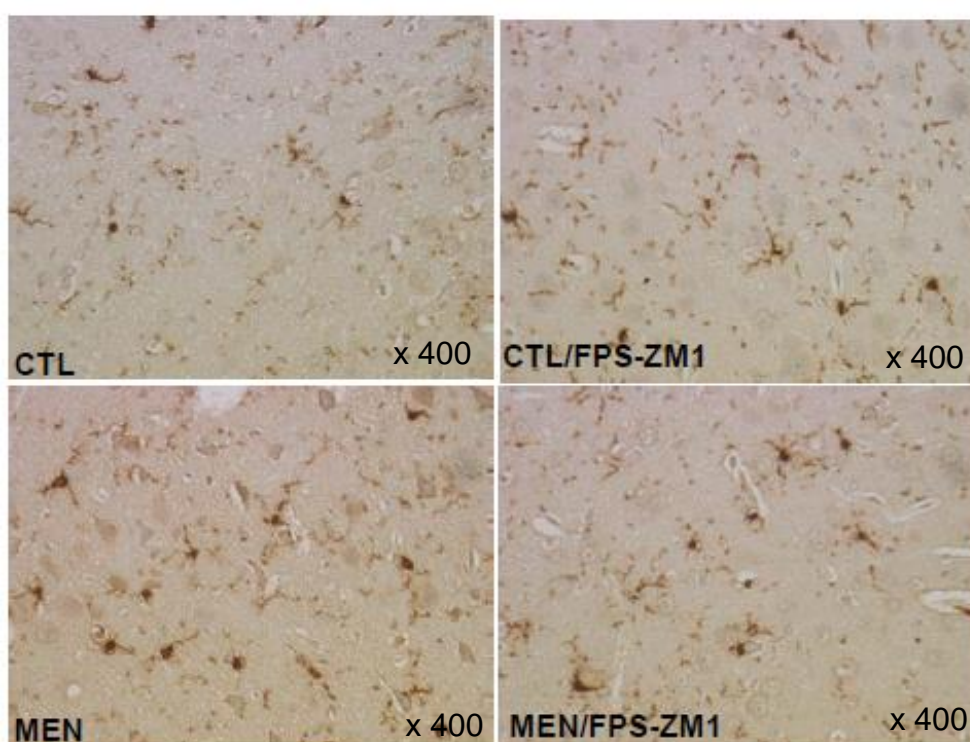




**Figura 8:** Expressão de RAGE;  $\beta$ -amilóide, CD11B; CD68, HMGB1; NLRP3, GFAP no hipocampo de ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de meningite pneumocócica. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SEM e os grupos foram comparados por meio ANOVA e teste de Tukey. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$  indicam significância estatística comparada ao grupo controle. # $p < 0,05$  indicam significância estatística quando comparados ao grupo da meningite. Figura elaborada pelo autor, 2019.

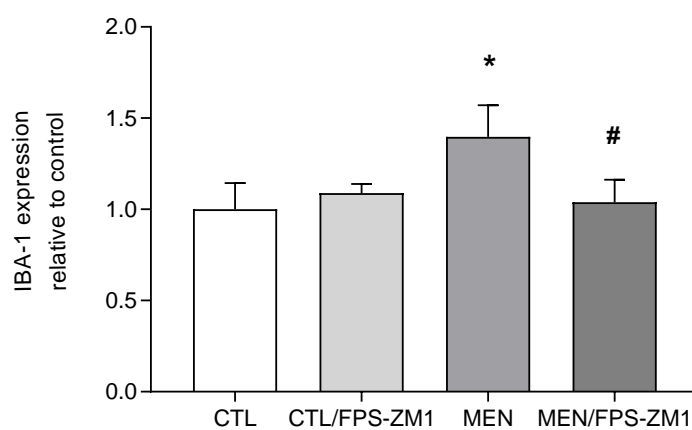
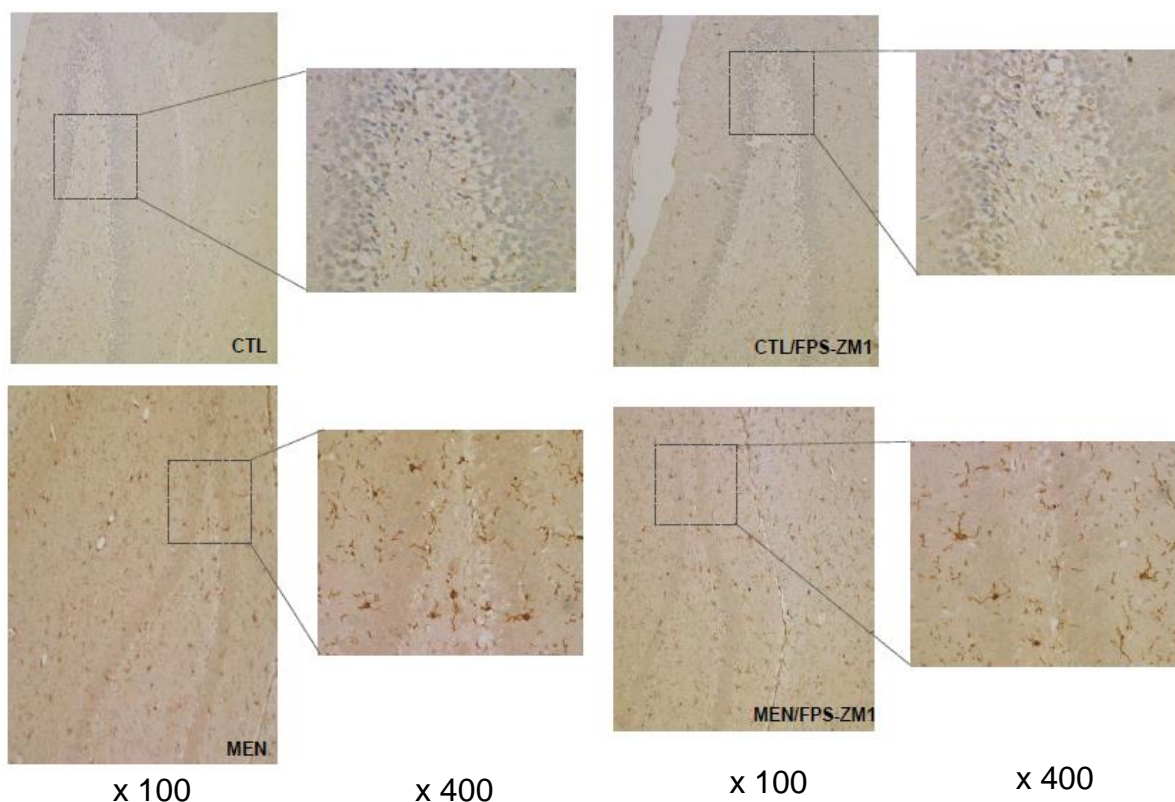
Na figura 9 pode-se observar através da técnica de imunohistoquímica marcadores de proteínas para identificar microglia (IBA-1) no córtex pré-frontal e hipocampo, 10 dias após a indução de meningite pneumocócica. Foi observado um número aumentado de células imunocoradas para IBA-1 no grupo meningite em comparação com o grupo controle no córtex pré-frontal (a) e no hipocampo (b) ( $p < 0.05$ ). No entanto, o tratamento com RAGE diminuiu a expressão de IBA-1 em ambas as estruturas cerebrais.

a)





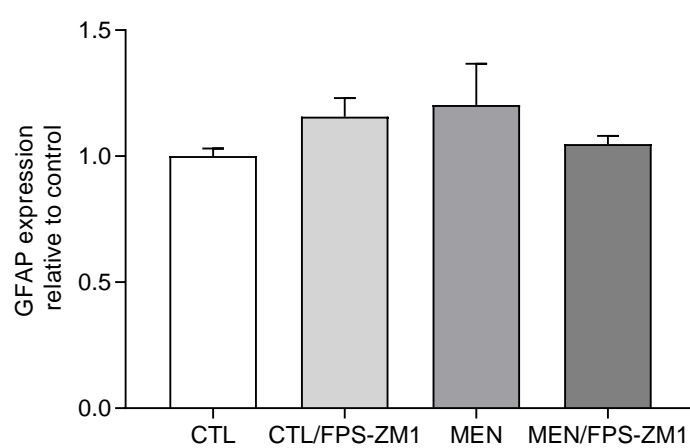
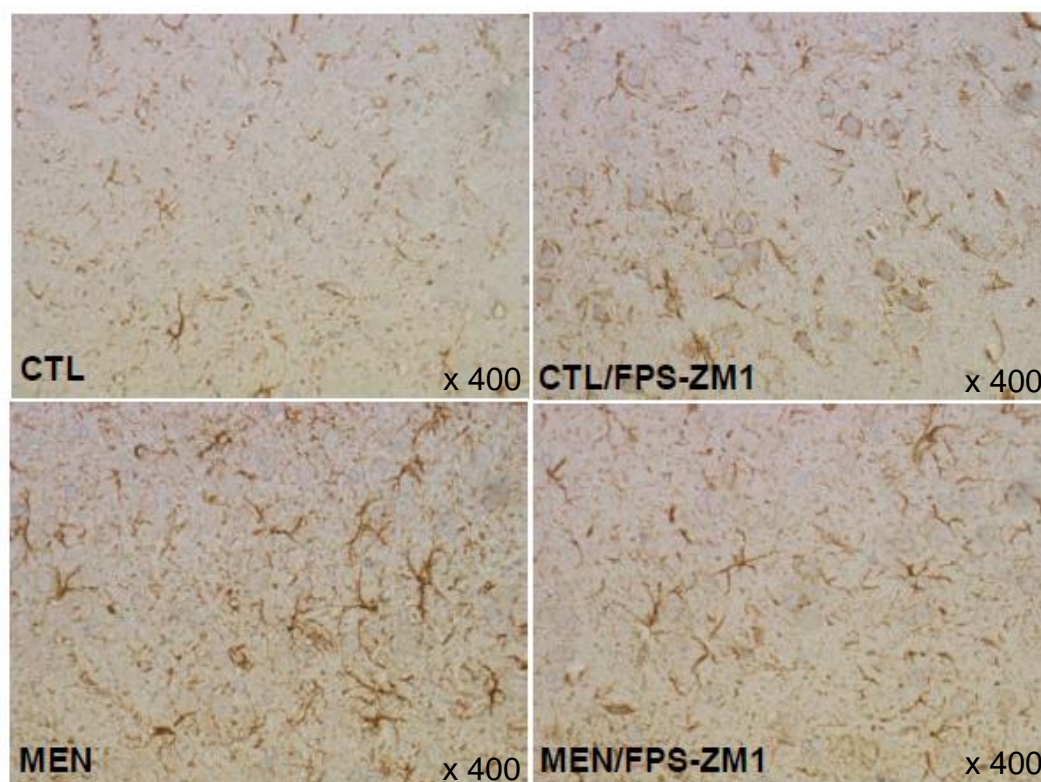
b)



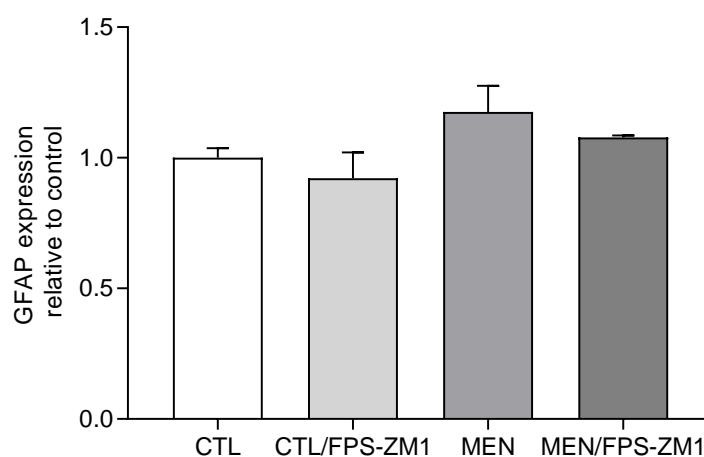
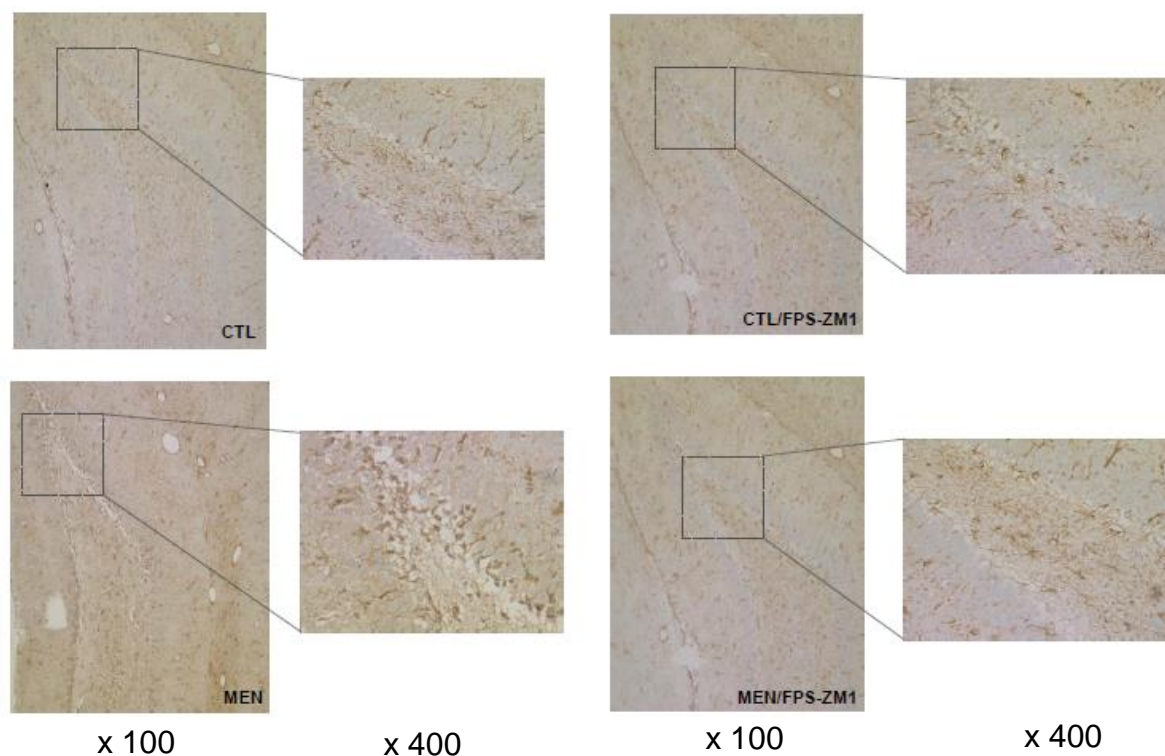
**Figura 9:** Imunohistoquímica de IBA-1 de ratos Wistar submetidos à meningite experimental. (a) Imagens microscópicas representativas de campo (ampliação  $\times 400$ ) imunocoradas com IBA-1 no córtex pré-frontal. (b) Imagens de campo microscópico representativas (ampliação  $\times 100$  e  $\times 400$ ) imunocoradas com IBA-1 no hipocampo. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$ ). \* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle. \*\*\* $p < 0,001$  em comparação com o grupo controle. # $p < 0,05$  em comparação com o grupo meningite,

A coloração para GFAP não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos em nenhuma as estruturas cerebrais analisadas (figura 10).

a)



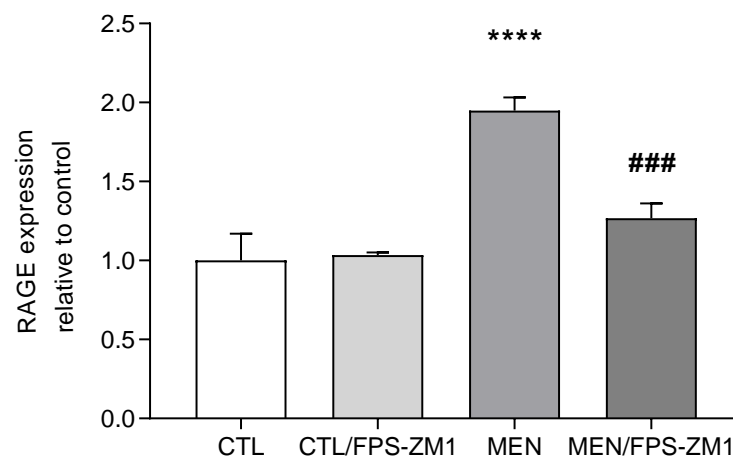
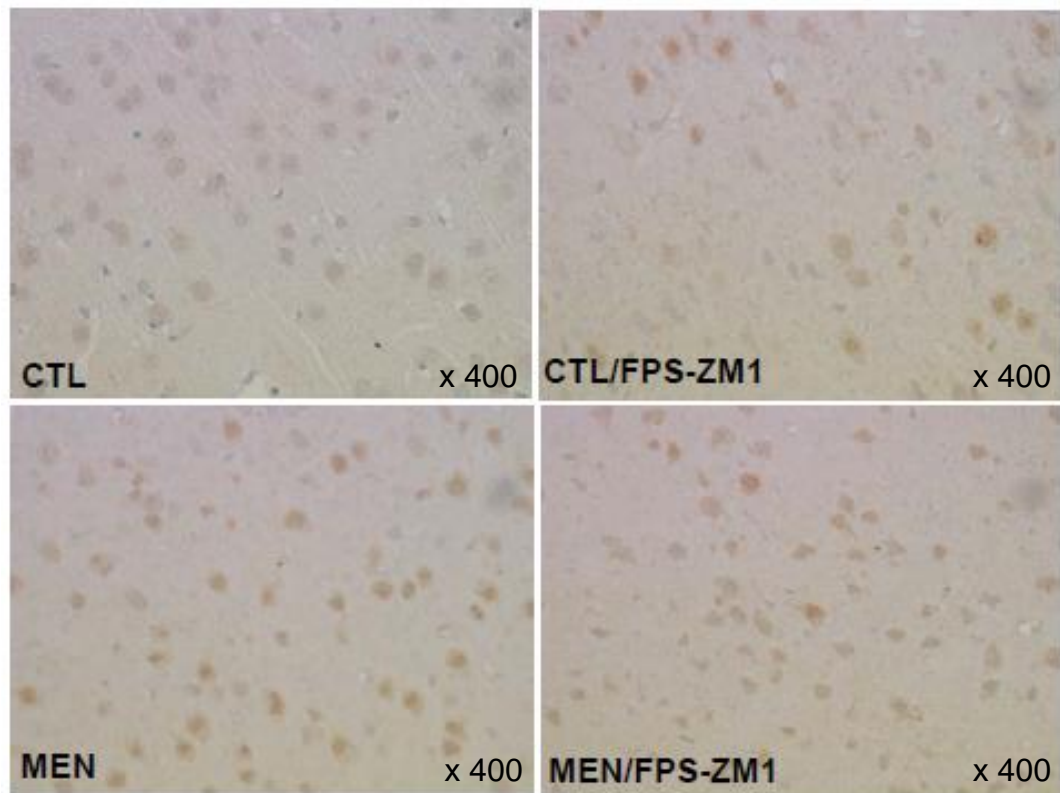
b)



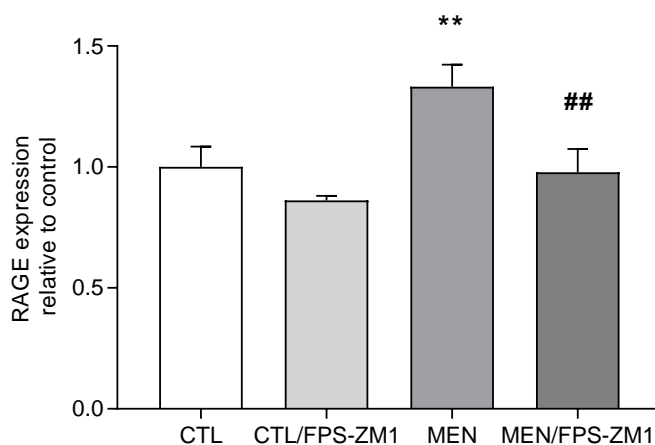
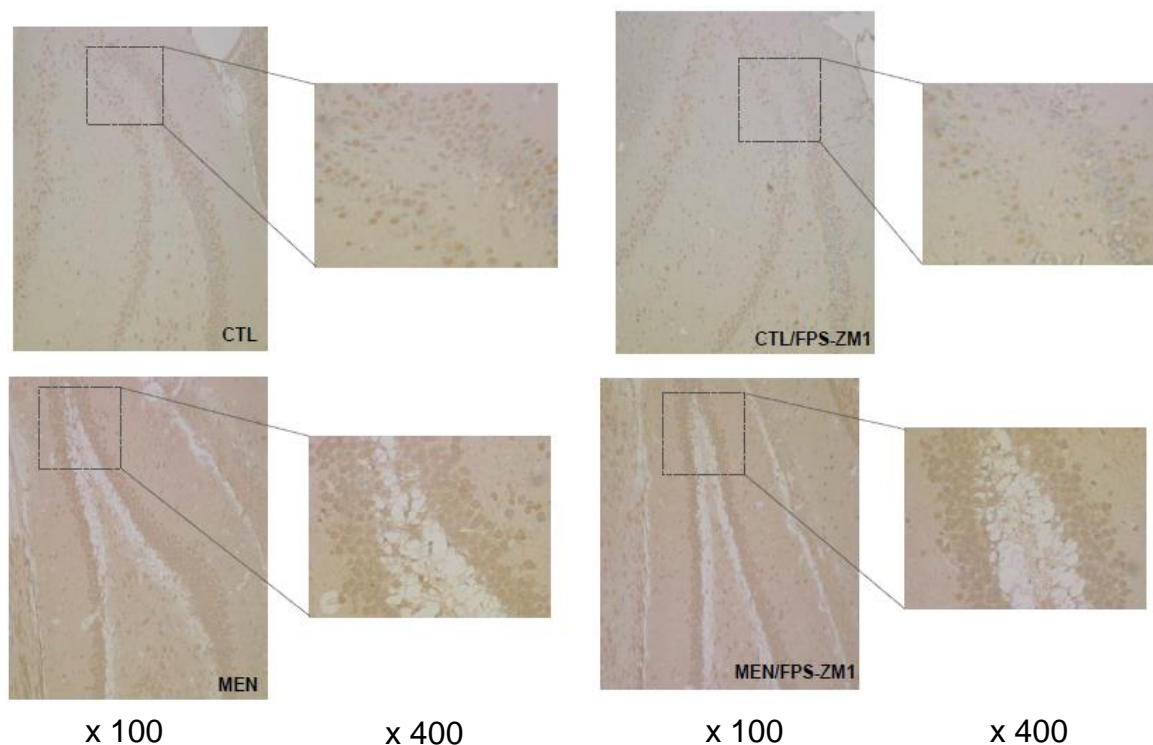
**Figura 10:** Imunohistoquímica de GFAP em ratos Wistar submetidos à meningite experimental. (a) Imagens microscópicas representativas de campo (ampliação  $\times 400$ ) imunocoradas com IBA-1 no córtex pré-frontal. (b) Imagens de campo microscópico representativas (ampliação  $\times 100$  e  $\times 400$ ) imunocoradas com IBA-1 no hipocampo.

Houve aumento na imucoloração de RAGE no grupo meningite em comparação com o grupo controle no córtex pré-frontal (figura 11a) e no hipocampo (11b,  $p < 0,01$ ). O tratamento com inibidor de RAGE diminuiu a imunocoloração em ambas as estruturas cerebrais em comparação com o grupo controle.

a)



b)



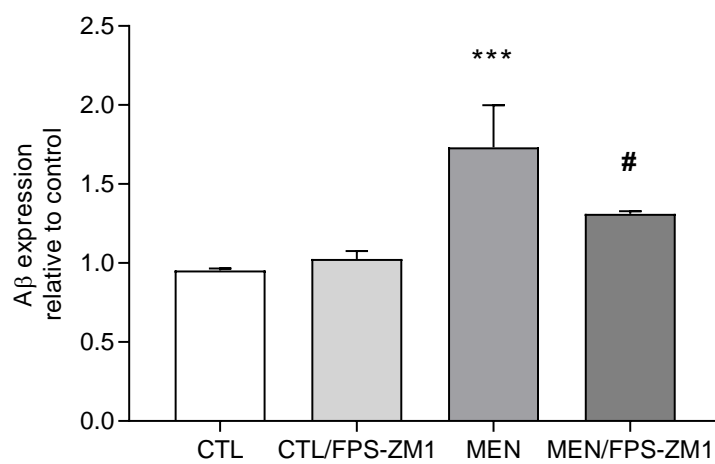
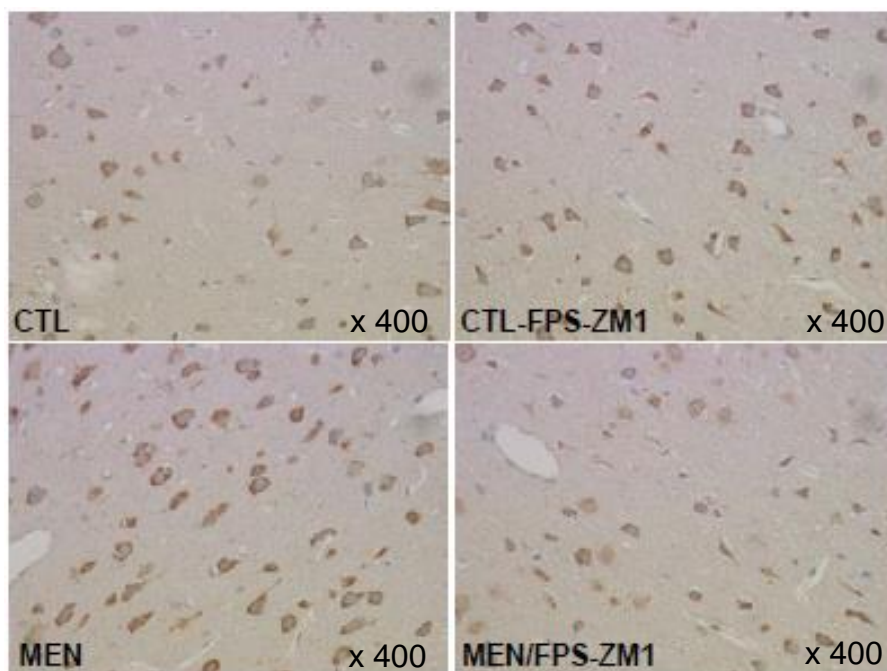
**Figura 11:** Imunohistoquímica de RAGE em ratos Wistar submetidos à meningite experimental. (a) Imagens microscópicas representativas de campo (ampliação  $\times 400$ ) imunocoradas com IBA-1 no córtex pré-frontal. (b) Imagens de campo microscópico representativas (ampliação  $\times 100$  e  $\times 400$ ) imunocoradas com IBA-1 no hipocampo. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$ ). \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle. \*\*\*\* $p < 0,0001$  em comparação ao grupo controle. ## $p < 0,01$  em comparação com o grupo meningite. ### $p < 0,001$  em comparação com o grupo meningite.

Na figura 12 a imunocoloração para  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> aumentou no grupo meningite em ambas as estruturas cerebrais em comparação com o grupo controle

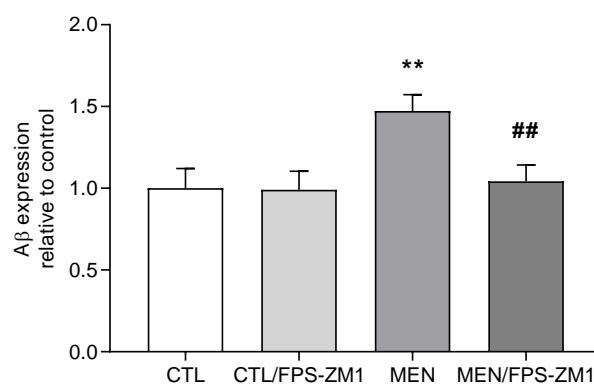
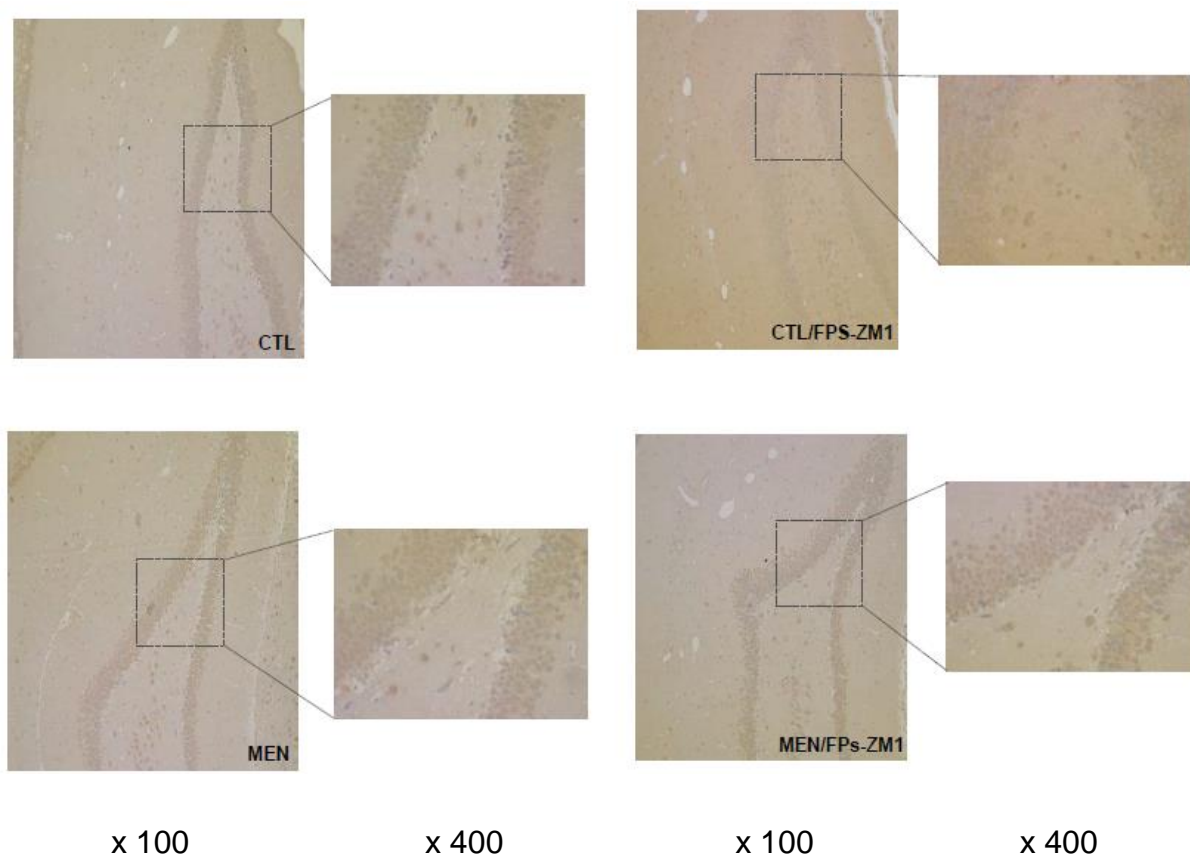


(a – córtex pré-frontal, b – hipocampo). Como esperado, o inibidor de RAGE diminuiu a imunocoloração  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> em comparação com o grupo controle.

a)



b)



**Figura 12:** Imunohistoquímica de  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> em ratos Wistar submetidos à meningite experimental. (a) Imagens microscópicas representativas de campo (ampliação  $\times 400$ ) imunocoradas com  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> no córtex pré-frontal. (b) Imagens de campo microscópico representativas (ampliação  $\times 100$  e  $\times 400$ ) imunocoradas com  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> no hipocampo. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$ ). \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle. \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle. # $p < 0,01$  em comparação com o grupo meningite. ## $p < 0,01$  em comparação com o grupo meningite.

## 5 DISCUSSÃO

A meningite bacteriana é uma das doenças infecciosas mais contagiosas e fatais em todo mundo. A compreensão de suas complexas funções fisiopatológicas torna-se, portanto, fundamental para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para evitá-la e erradicá-la. Ao investigar o RAGE – receptor do sistema imune inato – Costerus et al (2017) evidencia que a inibição desta molécula reduz algumas das mudanças fisiológicas e comportamentais características da meningite bacteriana, bem como as alterações ligadas ao princípio dos processos neurodegenerativos. Como ressalta Fritz (2011), o RAGE está envolvido na resposta inflamatória do hospedeiro, sendo capaz de reconhecer diversos ligantes com origens e características distintas. Soma-se a isso o fato de que esta importante molécula é capaz de identificar AGEs, membros da família de proteínas S100, fibrilas amiloides e  $\beta$ -amiloide, HMGB-1 e antígeno de macrófagos  $\beta$ -integrina 1 (Mac1) (Fritz, 2011; Harris et al., 2012).

Cunningham e Hennessy (2015) destacam que a inflamação sistêmica e a neuroinflamação são relevantes para o declínio cognitivo do envelhecimento cerebral. Em casos de sepse, a resposta endógena de proteção pode ser provocada pelo acionamento da via  $\beta$ -amiloide, HMGB-1 e RAGE/NF- $\kappa$ B. Tais reações auxiliam ainda na produção de mediadores inflamatórios e compostos neurotóxicos no cérebro (Meneghini et al., 2013). Ao investigar um modelo experimental de sepse, Comim et al. (2009) identifica altos níveis de HMGB-1, IL-1 $\beta$  e NADPH oxidase, marcadores que afetam o desenvolvimento cognitivo de longo prazo. Tendo em vista que tais mediadores pró-inflamatórios se relacionam ao RAGE e a sua contenção – e, portanto, revelam-se um importante objetivo do ponto de vista terapêutico –, evidencia-se a relevância de contribuições prévias na literatura sobre o tema. Como revela Nwariaku et al (2002), as citocinas tem o potencial de acionar membros das cinases da família Src (SFKs), que atuam na estabilização da disfunção da barreira endotelial relacionada à inflamação.

Os resultados do presente estudo demonstram que a meningite foi associada a níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias no córtex pré-frontal, e o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  apareceram aumentados no córtex pré-frontal 10 dias após a indução da meningite. Corroborando com nosso relato anterior que também demonstrou que o TNF- $\alpha$  permanece aumentado após o tratamento com antibióticos



no córtex frontal (Barichello et al., 2012) e foi associado a comprometimento cognitivo a longo prazo, (Barichello et al., 2013).

Bolton et al. (1998) identificou que a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), estimulada por citocinas, foi acompanhada de fosfotirosina elevada nos vasos sanguíneos *in vivo*. Pesquisa prévia (Barichello et al., 2011) com ratos jovens revelou que a BHE foi deteriorada entre 12 e 24 horas após a indução de meningite por *S. pneumoniae*. O momento da ruptura da BHE atrelou-se ao ápice dos níveis de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias durante a meningite. Por fim, outro experimento (De Vries et al., 1996), realizado *in vitro*, indicou que as citocinas levaram à quebra da BHE, revelando que essas moléculas acionam células endoteliais no cérebro para produzir eicosanoides – que, na sequência, levam à abertura da BHE.

Embora a ativação da microglia seja uma etapa crítica para o desenvolvimento de inflamação cerebral (Shigemoto et al., 2018). As células microglianas são macrófagos teciduais altamente especializados do SNC (Priller et al., 2109), a desregulação dessa célula desencadeia doenças neuropsiquiátricas, neurodegenerativas e neuroinflamatórias (Kierdorf et al., 2019). Em uma estratégia de pesquisa recente, as células da microglia também foram ativadas 10 dias após a indução da meningite, concomitantemente com um aumento da expressão de RAGE e  $\beta$ -amiloide no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos sobreviventes à meningite. O RAGE intensifica a ativação microglial e a resposta imune no cérebro de diferentes modelos experimentais, como sepse, diabetes mellitus tipo 2, doença de Alzheimer (Fang et al., 2018). Como encontrado nesta estratégia de pesquisa, as células da micróglia foram ativadas 10 dias após a indução da meningite concomitante com um aumento da expressão de RAGE e A $\beta$  no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos sobreviventes à meningite. Já a administração do inibidor de RAGE FPS-ZM1 acarretou uma importante diminuição nesses parâmetros.

A inflamação gerada no cérebro por ação da *S. pneumoniae* relaciona-se a uma severa reação imune, mas tal resposta pode ser mais prejudicial ao paciente do que o agente causador da patologia em si. As consequências verificadas após a inflamação supracitada incluem a exotoxina; a pneumolisina, que aciona o complemento; a ativação aprimorada de neutrófilos; o aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios – como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL6 –; a produção de óxido nítrico e o aumento de metaloproteinases de matrix – que são relevantes

marcadores na virulência do pneumococo (Leib et al., 2000; Cockeran et al., 2001) e atuam no aumento da lesão cerebral em casos de meningite bacteriana (Waage et al., 1989; Leib et al., 2000).

Uma das citocinas pró-inflamatórias liberadas por diversas células, o TNF- $\alpha$  pode ser sintetizado no SNC por microglia, astrócitos e algumas populações de neurônios após lesão cerebral (Lieberman et al., 1989). E, como destaca Harashima et al. (2001), também está atrelado ao acionamento do NF- $\kappa$ B, apoptose e necrose celular. Embora a carência de TNF- $\alpha$  não impeça o recrutamento de leucócitos e a diminuição da bacteremia no espaço subaracnóideo, experimentos com ratos sem os receptores de TNF, p55 e p75, revelaram a redução da inflamação (Wellmer et al., 2001). Sriram e O'callaghan (2007) ressaltam que altos níveis desta citocina vêm sendo atrelados a diversas doenças infecciosas, neurológicas, neurodegenerativas e neurotóxicas. Na pesquisa supracitada, testes com ratos apontaram que os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL6 encontravam-se elevados no córtex pré-frontal dos animais 24 horas após a indução à meningite, em comparação ao grupo de controle. No presente estudo, a administração do inibidor de RAGE FPS-ZM1 acarretou uma importante diminuição nesses parâmetros.

Um estudo posterior (Barichello et al., 2010) encontrou resultados parecidos, indicando a elevação dos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 no córtex pré-frontal 24 horas após a indução, mas com ausência de alterações no hipocampo. Tal fato pode ser atribuído às diferentes sensibilidades ao agente em cada uma das diversas regiões cerebrais. A expressão maior de um fator de transcrição específico (Gerlofs-Nijland et al., 2010) pode ser mais significativa de acordo com a área e a função da célula. Sarnico et al. (2009) ressaltam que o NF- $\kappa$ B vem sendo atrelado tanto à neurogênese quanto à sobrevivência neuronal por meio da expressão de genes anti-apoptóticos, apesar deste fator de transcrição ser também associado à neurodegeneração, devido às suas características pró-inflamatórias. O que se observa é que, de acordo com a área e a intensidade em que o NF- $\kappa$ B é expresso ou dependendo do tipo de célula é que se define a neuroproteção ou neurotoxicidade.

TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  apresentam diversas funções fisiológicas na resposta neuroinflamatória (Waage et al., 1989). Sabe-se que a IL-1 $\beta$ , especificamente, induz a produção de outras citocinas, bem como fatores de crescimento (Benveniste, 1992). Ambas elevaram a expressão de p75 em cultura de neurônios e astrócitos de hipocampus. E este receptor de neurotrofina é re-expresso em diversas condições,

como lesão cerebral traumática, convulsão, isquemia, estresse oxidativo e lesão axonal (Choi, 2001).

Barichello et al. (2009) aponta que a atividade da creatina cinase reduziu em 24 horas depois da indução de meningite por *S. pneumoniae*. Grandgirard et al. (2007), por sua vez, demonstrou, através de estudos com camundongos, que a apoptose no giro dentado de animais infectados com *S. pneumoniae* gerou um pico de 30 horas depois do contágio, seguido de uma redução da apoptose, retornando aos níveis normais em 40 horas (Grandgirard, et al., 2007). Esta pesquisa indicou uma elevação nos níveis de citocinas 24 horas após a infecção de meningite, próximo ao pico máximo de apoptose. Outras patologias neurodegenerativas, tais como esclerose múltipla e Parkinson, também apontam dados semelhantes. Os níveis de TNF- $\alpha$  também aparecem aumentados no LCR e nos tecidos de pacientes com Alzheimer e em cérebros post-mortem (Hofman et al., 1989)..

Conforme ressalta Costerus et al. (2017), níveis altos e prolongados de bacteremia favorecem a penetração do *S. pneumoniae* no espaço subaracnóideo, que se multiplica no LCR sem dificuldades após ultrapassar a BHE, podendo atingir até 109 UFCol/mL e colonizar toda a superfície cerebral (Zwijnenburg et al., 2006). Com o desenvolvimento bacteriano no espaço subaracnóideo, o *S. pneumoniae* gera uma reação imune acentuada por conta da liberação de componentes bacterianos (COIMBRA et al., 2006). A intensa deterioração da BHE, a produção de citocinas e a acumulação de leucócitos derivados do sangue no LCR são fatores relevantes para o desenvolvimento da patologia, causando a edema cerebral e lesão neuronal em meningite bacteriana (Leib; Tauber, 1999). Em pesquisa prévia (Shi et al., 2017), na qual a integridade da BHE foi danificada pela administração do anestésico volátil isoflurano, o tratamento com anticorpo anti-RAGE evidenciou que o RAGE possui relevante função na garantia da integridade da BHE.

Shen et al. (2017) ressalta que o declínio cognitivo na neurodegeneração pode ser retardado através de intervenções com inibidores de AGE, anticorpos anti-RAGE ou antagonistas de RAGE, obtendo resultados satisfatórios. Apesar da maior parte dos tratamentos atuais para meningite pneumocócica ser realizada através da eliminação da bactéria, estratégias que diminuam a resposta imune exacerbada também são importantes. A pesquisa supracitada foi realizada com animais expostos à meningite pneumocócica e, após 10 dias da intervenção, estes apresentaram prejuízo de memória de habituação e reconhecimento de objetos novos. Como

destaca Schwalm et al. (2014), há semelhanças entre o modelo experimental de neuroinflamação por meningite e o modelo de inflamação por sepse, no qual é registrado aumento de  $\beta$ -amiloide e danos cognitivos nos animais sobreviventes (Schwalm et al. 2014).

O estresse oxidativo intracelular é induzido por interações AGEs-RAGE, danificando células nervosas (Deane et al., 2009). Tal condição está implicada no desenvolvimento da doença de Alzheimer, gerando a deposição de  $\beta$ -amiloide, hiperfosforilação de tau e causando perda de neurônios e sinapses (Smith et al., 2000). Estudo de Ko et al. (2010) demonstrou que os AGEs auxiliam a expressão da proteína precursora amiloide, levando à produção de ERO, mas que os efeitos dos AGEs são interrompidos quando as células são pré-tratadas com um inibidor de ERO. Outra pesquisa (Gu et al., 2014) apontou que a interação de AGEs com RAGE induz a produção de ERO através de NADPH oxidase, gerando, por fim, estresse oxidativo. Tal condição, por sua vez, propicia a degeneração neuronal e pode gerar comprometimento cognitivo ao longo do envelhecimento e em patologias neurodegenerativas, como esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e depressão (Lindqvist et al., 2017). Já em casos de sepse, o estresse oxidativo está ligado diretamente ao comprometimento cognitivo em um modelo animal (Barichello et al., 2009).

A análise de cultura de células primárias de micróglia (Shen et al., 2017) evidenciou que o aumento da expressão de RAGE elevou os parâmetros de estresse oxidativo e inflamação. Porém, o tratamento com inibidor de RAGE, FPS-ZM1 protegeu a microglia primária do estresse oxidativo garantindo melhora no dano neurológico. Ainda de acordo com Shen et al. (2017), o FPS-ZM1 suprimiu consideravelmente o aumento da expressão do RAGE induzida por AGEs, à ativação microglial dependente de RAGE, a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e a expressão de mediadores inflamatórios a jusante, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2, prostaglandina, iNOS e NO.

Soma-se a isso o fato de que o FPS-ZM1 diminuiu a expressão de NADPH oxidase (NOX) estimulada por AGEs e a expressão de ERO (Shen et al., 2017). Assim, a diminuição do RAGE com um inibidor específico, o FPS-ZM1, também se revela uma terapia complementar para o tratamento de patologias pneumocócicas. O FPS-ZM1, que é um inibidor específico de RAGE de alta afinidade, impede a ligação de  $\beta$ -amiloide ao domínio V de RAGE e diminui o

estresse celular ocasionado por  $\beta$ -amiloide40 e  $\beta$ -amiloide42. Este inibidor foi identificado em células que expressam RAGE *in vitro* e no cérebro de camundongos *in vivo*. Conforme ressalta Deane et al. (2012), o FPS-ZM1 não é tóxico para ratos e atravessava a BHE sem dificuldades. A ativação de RAGE acarreta diversas cascatas de sinalização da resposta imune, como a ERK 1/2, que ativa NF- $\kappa$ B e consequentemente a transcrição de genes pró-inflamatórios. Depois desta ativação, o estresse oxidativo aumenta, ampliando, por sua vez, a expressão de RAGE, gerando um ciclo vicioso que propicia a neuroinflamação (Tobon-Velasco et al., 2014).

Alguns autores (Srikanth et al., 2011; Li et al., 2012) associam a expressão de RAGE no SNC à neuroinflamação, quebra da BHE e neurodegeneração. Deane et al. (2012), por sua vez, revelou que, em estudos com camundongos transgênicos, o FPS-ZM1 diminui consideravelmente o acionamento microglial e a expressão relacionada à NF- $\kappa$ B de citocinas pró-inflamatórias induzidas por micróglia – inclusive TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no hipocampo e no córtex. Estudo posterior (Shen et al., 2017) comparou as proteínas extraídas do núcleo em relação ao citoplasma e revelou que a ativação do RAGE ampliou a translocação do NF- $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo. Este efeito, porém, foi diminuído nas culturas de células tratadas com FPS-ZM1. O modelo animal com administração de AGEs diretamente no hipocampo apresentou níveis aumentados de NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no hipocampo dos ratos, no entanto, o tratamento com FPS-ZM1 reverteu tais condições (Hong et al., 2016).

A pesquisa de Zhang et al. (2016), por sua vez, recorreu à hipericina, o que acarretou a considerável diminuição da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS e da produção de NO na micróglia, propiciada por oligômero de  $\beta$ -amiloide42. Os parâmetros de memória e aprendizagem também foram verificados no labirinto aquático, constando-se que a droga pode ser eficaz no tratamento da doença de Alzheimer. Cérebros de pacientes com esta patologia apresentam altos níveis de AGEs e a interação com seu receptor desempenha um papel relevante. O FPS-ZM1 impede a ligação de  $\beta$ -amiloide ao RAGE, reduzindo o prejuízo neurológico e a inflamação em modelo de rato transgênico (Deane et al., 2012). Em um modelo animal com ratos submetidos à injeção intra-hipocampal de AGEs, com administração intraperitoneal de FPS-ZM-1, verificou-se provável efeito neuroprotetor.

Neste estudo a produção gradativa de  $\beta$ -amiloide é verificada em animais expostos à meningite pneumocócica e a diminuição do RAGE inibiu tais efeitos após 10 dias da indução, apontando uma possível ligação entre o RAGE e a  $\beta$ -amiloide. Investigações prévias apontam que a inibição de RAGE evitou a produção de  $\beta$ -amiloide, inflamação, estresse oxidativo e déficits cognitivos em um modelo animal de doença de Alzheimer e em ratos que receberam AGE intra-hipocampo (DEANE et al., 2012).

A HMGB-1, importante DAMP liberado no processo inflamatório gerado por conta meningite bacteriana, é encontrada no LCR de pacientes com essa enfermidade (Tang et al., 2008). O reconhecimento desta proteína é realizado através dos receptores TLR2, TLR4 e RAGE (Meneghini et al., 2013). Sua relevância na inflamação ocasionada pela meningite pneumocócica foi verificada pela administração auxiliar de um anticorpo em modelo animal, acarretando a redução da mortalidade dos camundongos doentes (Ma.Ouris et al., 2017).

Já a pesquisa realizada por Hohne et al, (2013) evidenciou uma liberação de grande quantidade de HMGB-1 no LCR de animais adultos com meningite pneumocócica, identificando ainda que a concentração se elevava ainda mais após 45 horas de infecção, em comparação com os dados obtidos 24 horas depois da indução. Neste estudo, verificou-se que a inflamação foi resolvida mais rapidamente em ratos tratados com um antagonista do HMGB-1. No entanto, a análise dos animais com meningite pneumocócica não revelou modificações na expressão de HMGB-1 no hipocampo e córtex pré-frontal.

Zilka et al. (2012) destaca que a relação entre RAGE e fosforilação de tau no cérebro pode associar-se à regulação ascendente de RAGE causada pela ativação de microglia e astrócitos, pela liberação de mediadores pró-inflamatórios para o meio extracelular e consequente ativação de caminhos neurotóxicos nos neurônios envolvidos na fosforilação da tau. No SNC, o RAGE é acionado e controlado por ligantes e citocinas gerados externamente, de maneira que seus efeitos intracelulares se dão simultaneamente a sua ativação. Uma das consequências é a fosforilação da AKT, que está ampliada juntamente com os marcadores de RAGE, elementos significativos em processos neurodegenerativos e inflamatórios (Dent, 2014).

Em patologias neurodegenerativas, a ativação neuronal de ERK 1/2 está comumente atrelada à GSK3- $\beta$ , que, em cascata, regula a fosforilação de tau,

enquanto na glia estas cinases associam-se à inflamação (Kamat et al., 2014). Um dos efeitos da ligação RAGE é o acionamento de NF- $\kappa$ B através de ERK 1/2, que, por sua vez, ativa citocinas inflamatórias e a transcrição de RAGE. De maneira alternada, a ativação de Akt atrela-se a respostas de sobrevivência, inclusive a inibição da ativação pró-inflamatória e a depuração autofágica de agregados proteicos (Heras-Sandoval et al., 2014). Evidências coletadas através de levantamento bibliográfico e dados encontrados neste estudo apontam que, nas primeiras horas da meningite pneumocócica, as citocinas podem atuar como um biomarcador para danos cerebrais. Dessa forma, contribuem ainda para o desenvolvimento da medicina e de um tratamento mais eficaz ou protetivo, capaz de diminuir os danos consequentes da patologia em questão.

O aumento da expressão de RAGE pode iniciar várias ações, como o transporte de  $\beta$ -amiloide circulante para o cérebro, aumentar a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, facilitar o tráfego de células imunes através da BBB, aumenta a resposta neuroinflamatória pelas células endoteliais, implicando no desenvolvimento inicial da doença de Alzheimer em modelos experimentais e exacerbando a patologia dos pacientes acometido pela doença de Alzheimer (Pugazhenthil et al., 2017)

Pesquisas prévias (Gasparotto et al., 2017) indicam que o RAGE é relevante para as alterações bioquímicas e comportamentais em modelo de inflamação por sepse, geralmente atreladas ao começo de processos neurodegenerativos. Trata-se de uma importante perspectiva para a compreensão de fatores semelhantes, que podem associar processos de inflamação sistêmica aguda à ativação de sinalização neurodegenerativa associada no SNC. Conforme evidenciado na presente pesquisa, a ação do RAGE ao longo do episódio inflamatório, consequente da indução à meningite pneumocócica, pode relacionar-se a patologias neurodegenerativas tardias.

Pesquisa realizada no Japão (Takeshita et al., 2017) indica que polimorfismos no gene que codifica o RAGE podem estar atrelados à suscetibilidade genética ao desenvolvimento de Alzheimer. A revisão de literatura sobre novos tratamentos para essa patologia (Panza et al., 2016) indica que a maioria das pesquisas sobre atenuação dos sintomas atua com um inibidor da enzima de clivagem de  $\beta$ -secreção (BACE) (verubecestat), três anticorpos monoclonais anti- $\beta$ -

amiloide (solanezumab, gantenerumab e aducanumab), um inibidor do RAGE (azeliragon) e a combinação de cromolônio de sódio e ibuprofeno (ALZT-OP1).

O início genético da doença de Alzheimer é responsável por 5% dos casos, porém os 95% restantes tem um início diverso (Bakhta et al., 2019). Uma infecção pode apresentar um potencial importante de conduzir um papel em casos esporádicos da doença de Alzheimer (Giridharan et al., 2019). Na sepse experimental, os marcadores RAGE,  $\beta$ -amiloide e microglia foram aumentados no cérebro de ratos do tipo selvagem. Apesar da sepse desencadear inflamação cerebral e comprometimento cognitivo, a injeção intracerebral de anticorpo RAGE no hipocampo reduziu o acúmulo de  $\beta$ -amiloide, diminuiu a expressão de RAGE e a ativação das células microgliais e preveniu déficits comportamentais associados ao comprometimento cognitivo em sobreviventes de sepse (Gasparotto et al., 2018). Segundo Golde (2016) a possibilidade é que  $\beta$ -amiloide atue como um peptídeo antimicrobiano, e o patógeno desencadeie a produção e a deposição de  $\beta$ -amiloide no cérebro, iniciando a cascata patológica associada à patologia da doença de Alzheimer.

Outros estudos apóiam a hipótese do papel de agentes infecciosos na patologia da doença de Alzheimer, como *Porphyromonas gingivalis* (Dominy et al., 2019) *Toxoplasma gondii* (Torres et al., 2018) e infecções por vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) (De Chiara et al., 2019). A hipótese inflamatória foi recentemente reforçada por estudos de associação em todo o genoma, que identificaram genes para receptores imunes que foram associadas a um aumento no risco da Doença de Alzheimer, considerando o receptor desencadeador expresso nas células mielóides-2 (TREM-2) (Guerreiro et al., 2013) e CD33 (Gricius et al., 2013).

Qualquer que seja a causa, essa sequência de eventos gerados pela meningite pneumocócica persiste por muito tempo após a resolução da infecção e recuperação, no entanto, eles podem desencadear um declínio neurocognitivo. O eixo RAGE/ $\beta$ -amiloide é uma característica comum subjacente a muitas infecções, doenças crônicas e neurodegenerativas. Evidencia-se, portando, a relevância da inibição do RAGE no desenvolvimento desta doença neurodegenerativa. E, diante da tendência do envelhecimento populacional na contemporaneidade, a perspectiva é de que a incidência de doenças como essa torne-se cada vez mais comum.



## 6 CONCLUSÃO

Este estudo ratificou a importância do RAGE na neuroinflamação ocasionada pela meningite pneumocócica. A investigação provou que os ratos Wistar tiveram níveis elevados de HMGB1, de deposição de  $\beta$ -amiloide e da expressão de RAGE no córtex pré-frontal e no hipocampo 10 dias após serem submetidos ao modelo experimental de meningite pneumocócica. O tratamento com um inibitório de RAGE se fez eficiente na proteção neuronal, possibilitando minimizar os danos ocasionados por esta doença. Embora este estudo comprove a atuação de RAGE em doenças neurodegenerativas, outras pesquisas precisam ser realizadas de maneira que as anomalias prováveis que a neuroinflamação por meningite pneumocócica venha ocasionar, sejam averiguadas e atenuadas.

## 7 REFERÊNCIAS

Alison, D.J., & Ditor, D.S. (2015) *Spinal Cord*, 53: 14-18.

Ballard CG Gauthier S Cummings JL et al. Management of agitation and aggression associated with Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurol*. 2009; 5: 245-255.

Barichello T, Generoso JS, Simoes LR, Elias SG, Tashiro MH, Dominguni D et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase prevented cognitive impairment in adult Wistar rats subjected to pneumococcal meningitis. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine* 2013; 162(6): 390-397.

Barichello T, Milioli G, Generoso JS, Cipriano AL, Costa CS, Moreira AP et al. Imipramine reverses depressive-like parameters in pneumococcal meningitis survivor rats. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 2012; 119(6): 653-660.

Barichello T, Savi GD, Silva GZ, Generoso JS, Bellettini G, Vuolo F, Petronilho F, Feier G, Comim CM, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Antibiotic therapy prevents, in part, the oxidative stress in the rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci Lett*. 2010;478(2):93-6.

Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Vol. 50 Nº 03, 2019: Meningites bacterianas não especificadas, Brasil, 2007 a 2016.

Brouwer MC, De Gans J, Heckenberg SG, Zwinderman AH, Van Der Poll T, Van De Beek D. Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(1):31-44.

Brouwer MC, Tunkel AR, Van De Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):467-92.

Collodel, Allan Minatto. Inibidor de RAGE previne disfunção cognitiva e reduz mediadores inflamatórios em um modelo experimental de meningite pneumocócica.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma; 2017. p.92.

Costerus JM, Brouwer MC, Bijlsma MW, Van De Beek D. Community-acquired bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30(1):135-41.

Cox RW, Reynolds RC, Taylor PA (2016) AFNI and clustering: False positive rates redux. *bioRxiv* doi:10.1101/065862.

Edmond K, Clark A, Korczak VS, Sanderson C, Griffiths UK, Rudan I. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(5):317-28.

Ellis J, Luintel A, Chandna A, Heyderman RS. Community-acquired acute bacterial meningitis in adults: a clinical update. *Br Med Bull.* 2019;131(1):57-70.

Engelen-Lee JY, Brouwer MC, Aronica E, Van De Beek D. Pneumococcal meningitis: clinical-pathological correlations (MeninGene-Path). *Acta Neuropathol Commun.* 2016;426.

Epidemiologia CND. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, 2005.

Feigin RD, Pearmon E. Bacterial Meningitis. In: Feigin RD, Cherry JD. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998. p.400-29.

Grandgirard D, Schurch C, Cottagnoud P, Leib SL. Prevention of brain injury by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2173-8.

Grandgirard D, Steiner O, Tauber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 2007;114(6):609-17.

Grimwood K, Anderson P, Anderson V, Tan L, Nolan T. Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch Dis Child*. 2000;83(2):111-6.

Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;125050-5.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353-6.

Hoogman M, Van De Beek D, Weisfelt M, De Gans J, Schmand B. Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(10):1092-6.

Irazuzta J, Pretzlaff RK, Zingarelli B. Caspases inhibition decreases neurological sequelae in meningitis. *Crit Care Med*. 2008;36(5):1603-6.

Irazuzta JE, Pretzlaff RK, Zingarelli B, Xue V, Zemlan F. Modulation of nuclear factor-kappaB activation and decreased markers of neurological injury associated with hypothermic therapy in experimental bacterial meningitis. *Crit Care Med*. 2002;30(11):2553-9.

Ji et al.,2015X. Ji, D.B. Dadon, B.J. Abraham, T.I. Lee, R. Jaenisch, J.E. Bradner, Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF, Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis in humans. *Neurology*. 2002;58(2):186-91.

Kierdorf K, Prinz M. Microglia: Same same, but different. *The Journal of experimental medicine* 2019.

Leal RB, Cordova FM, Herd L, Bobrovskaya L, Dunkley PR. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;178(1):44-51.

Liechti FD, Grandgirard D, Leib SL. Bacterial meningitis: insights into pathogenesis and evaluation of new treatment options: a perspective from experimental studies. *Future Microbiol.* 2015;10(7):1195-213.

Liechti FD, Grandgirard D, Leib SL. Bacterial meningitis: insights into pathogenesis and evaluation of new treatment options: a perspective from experimental studies. *Future Microbiol.* 2015;10(7):1195-213.

Lucas MJ, Brouwer MC, Van De Beek D. Neurological sequelae of bacterial meningitis. *J Infect.* 2016;73(1):18-27.

Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, Van Der Poll T, Van De Beek D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(3):557-91.

Mueller JE, Yaro S, Ouedraogo MS, Levina N, Njanpop-Lafourcade BM, Tall H, Idohou RS, Sanou O, Kroman SS, Drabo A, Nacro B, Millogo A, Van Der Linden M, Gessner BD. Pneumococci in the African meningitis belt: meningitis incidence and carriage prevalence in children and adults. *PLoS One.* 2012;7(12):20.

Parihar MS, Hemnani T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci.* 2004;11(5):456-67.

Priller J, Prinz M. Targeting microglia in brain disorders. *Science (New York, NY)* 2019; 365(6448): 32-33.

R.A.Young Chromatin proteomic profiling reveals novel proteins associated with histone-marked genomic regions *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112 (2015), pp. 3841-3846.

Rivest S: Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.* 9:429–439. 2009.

Saez-Llorens X, McCracken Jr GH. Antimicrobial and antiinflammatory treatment of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13: 619-35.

Selkoe D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001;81(2):741- 66.

Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Sato K. Activated Microglia Disrupt the Blood-Brain Barrier and Induce Chemokines and Cytokines in a Rat in vitro Model. *Frontiers in cellular neuroscience* 2018; 12: 494.

Stefanis L, Park DS, Friedman WJ, Greene LA. Greene, caspase-dependent and independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. *J Neurosci.* 1999;19(15):6235-47.

Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL, Harrison LH, Farley MM, Reingold A, Bennett NM, Craig AS, Schaffner W, Thomas A, Lewis MM, Scallan E, Schuchat A. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *N Engl J Med.* 2011;364(21):2016-25.

WHO – World Health Organization (2011). Laboratory Methods for the diagnosis of meningites caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenza*.

## **ANEXOS**

## ANEXO A: Certificado da aprovação do CEUA



**Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "*Papel da via  $\beta$ -amilóide-RAGE na disfunção cognitiva tardia na meningite bacteriana*", Protocolo nº 021/2015-2 sob a responsabilidade de *Josiane Budni* equipe: *Amanda Valnier Steckert, Jaqueline S. Generoso, Lúiana R. Simões, Ana Paula Moreira, Diogo Domingui, Débora B. Tomaz, Jéssica A. Goularte, Cássia P. Rafael, Cristiano Julio Faller, Gustavo Sangiogo da Silva, Monique Michels, Felipe Dal Pizzol, Tatiana Barichello e João Luciano de Quevedo* que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Vigência do Projeto	03/09/2015 a 20/12/2016
Espécie/Inhagem	Ratos Wistar
Nº. De animais	158
Peso/Idade	60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

**Protocol number: 021/2015-2**

**Principal Investigator:** *Josiane Budni.*

**Researchers:** *Amanda Valnier Steckert, Jaqueline S. Generoso, Lúiana R. Simões, Ana Paula Moreira, Diogo Domingui, Débora B. Tomaz, Jéssica A. Goularte, Cássia P. Rafael, Cristiano Julio Faller, Gustavo Sangiogo da Silva, Monique Michels, Felipe Dal Pizzol, Tatiana Barichello e João Luciano de Quevedo.*

**Project title:** *Role of  $\beta$ -amyloid-RAGE pathway in the late cognitive impairment in bacterial meningitis.*

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 08 de setembro de 2015.

**JAIRO JOSÉ ZOCHE**  
 Coordenador da CEUA